



PREMIS A TREBALLS DE RECERCA DE LA UdL
per a l'estudiantat de batxillerat i cicles formatius de grau superior

Les aquaporines, els canals d'aigua de les cèl·lules

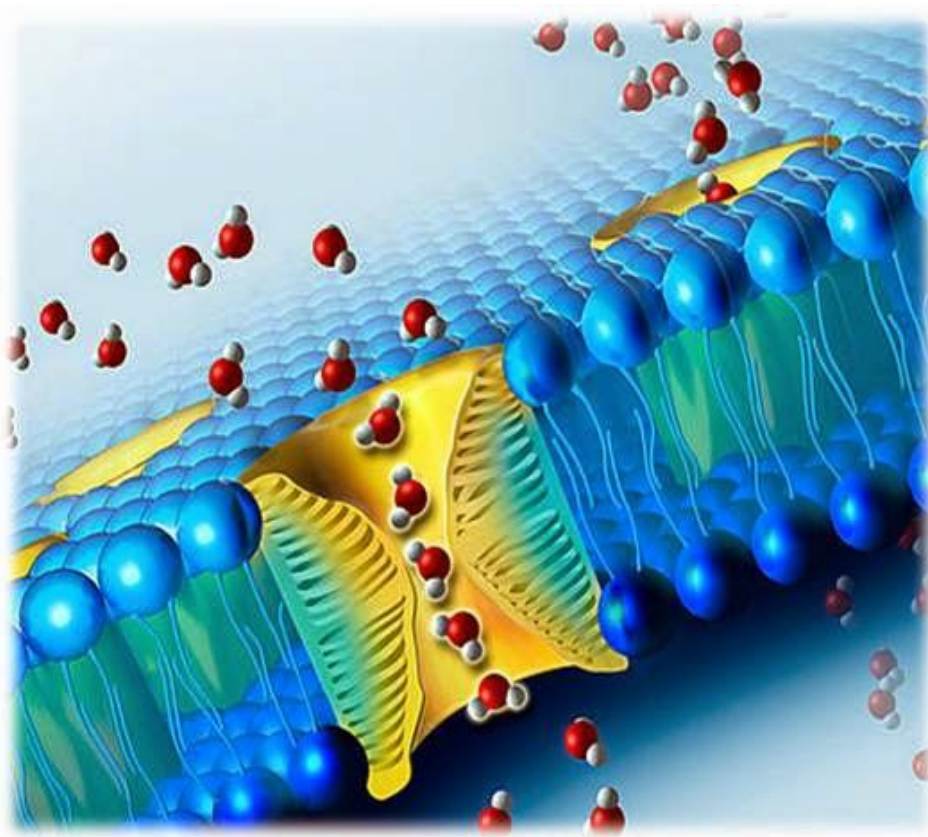
Ada Oliva Quílez

Tutor/a: Xavier Llobera Rames

Centre: Col·legi Maristes
Montserrat (Lleida)

Data: 2019

LES AQUAPORINES, ELS CANALS D'AIGUA DE LES CÈL·LULES



Treball de Recerca

[Redacted]

2018-2019

Tutor:

[Redacted]

Col·legi

[Redacted]

2n Batxillerat

“Well, all life forms are dependent upon water”

Peter Agre

Agraïments

Aquest treball ha estat possible gràcies al programa Bojos per la Bioquímica, en especial, al Doctor [REDACTED] per la seva ajuda durant tot el procés.

Gràcies al meu tutor i professor de biologia, el [REDACTED], per haver-me aconsellat i guiat al llarg de l'elaboració d'aquest treball.

Agraeixo també al professor de la UAB [REDACTED] per l'orientació i la informació facilitada, i a la Doctora [REDACTED] per la seva ajuda i dedicació durant tota la pràctica al laboratori.

A l'embrióloga [REDACTED] per haver-me realitzat una visita al banc de semen i per haver respost als meus dubtes amb molt d'interès.

Als meus pares ja que sense la seva paciència i suport aquest treball no hagués estat possible. I també a tots aquells que m'envolten i m'han donat suport durant tot aquest temps.

Moltes gràcies.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ	6
2. LES AQUAPORINES	8
2.1 Què són?	8
2.2 Història del descobriment.....	8
2.3 Classificació	12
2.4 Estructura	13
2.5 Permeabilitat.....	15
2.6 Regulació	18
3. LES AQP EN L'APARELL REPRODUCTOR MASCULÍ DELS MAMÍFERS	19
3.1 Aparell reproductor masculí dels mamífers	19
3.1.1 Els testicles.....	19
3.1.2 Vies espermàtiques.....	21
3.1.3 Glàndules annexes	23
3.1.4 Genitals externs	24
3.2 Formació, maduració i capacitació del semen.....	25
3.3 Localització de les aquaporines	28
3.4 Funcions de les aquaporines.....	30
3.4.1 Dades a destacar	30
3.4.2 Funcions suggerides.....	32
4. LES AQUAPORINES EN L'ESPERMA DELS MAMÍFERS	33
4.1 Esperma dels mamífers.....	33
4.2 Estructura dels espermatozoides.....	33
4.3 Localització de les aquaporines	34
4.4 Funcions de les aquaporines.....	35
4.4.1 Dades a destacar	36
4.4.2 Funcions suggerides.....	37
5. AQUAPORINES I CRIOBIOLOGIA DE SEMEN	38

5.1 Criopreservació	38
5.2 Tipus de Criopreservació.....	38
5.2.1 Congelació lenta	38
5.2.2 Vitrificació	38
5.3 Problemes en la criopreservació.....	39
5.4 Funció de les aquaporines	39
6. VISITA A BANC DE SEMEN.....	41
6.1 Explicació	41
6.2 Preguntes	42
7. PRÀCTICA DE LABORATORI	44
7.1 Hipòtesi	45
7.2 Materials i reactius utilitzats.....	45
7.3 Westerns Blots	48
7.3.1 Electroforesi.....	48
7.3.2 Transferència	65
7.3.3 Bloqueig i detecció.....	71
7.3.4 Revelar	77
7.4 Resultats	84
7.4.1 Gels AQP2	84
7.4.2 Gels AQP9	85
8. CONCLUSIONS.....	87
9. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA.....	89
9.1 Articles.....	89
9.2 Webs.....	89
9.3 Llibres	90

1. INTRODUCCIÓ

Sempre havia pensat que el treball de recerca havia de tractar un tema que m'agradés molt, un tema que m'interessés i em motivés a saber-n'hi més. Per aquest motiu, quan va arribar el moment d'escollir el meu treball de recerca vaig tenir certes dificultats en decidir-me, volia trobar el tema correcte i, tot i que pensava en quelcom relacionat amb la ciència i la investigació, no tenia clar que era el que estava buscant.

Tot i així, al final em vaig decidir pel tema de la criopreservació. Aquest era un tema que sempre havia trobat interessant i, a més, és un tema important en diversos camps com per exemple el de les Tècniques de Reproducció Assistida. Per tant, vaig pensar que centrant-me en la criopreservació del semen el podria conèixer de més a prop.

En aquell moment em trobava en un programa de ciència anomenat Bojos per la Bioquímica, gràcies al qual, vaig poder contactar amb el Doctor [REDACTED] [REDACTED] coordinador del programa i professor de la Facultat de Biologia de la UB. Aquest, al conèixer el meu tema, em va posar amb contacte amb en [REDACTED], professor de la facultat de Veterinària de la UAB, que havia tret diversos estudis sobre el tema. Ell em va desaconsellar tractar el tema de la criopreservació ja que la part pràctica no era viable, quelcom que va canviar del tot el que jo havia planejat.

Va ser en aquell moment quan em va parlar de les aquaporines, unes proteïnes descobertes recentment, les quals resultaven tenir una gran rellevància científica ja que la seva funció principal és el transport ràpid d'aigua, el component principal de la vida. De manera que el desenvolupament en la investigació d'aquestes proteïnes podria implicar grans avenços no sols en la medicina, sinó també en altres camps com en la veterinària o fins i tot la indústria.

Mai havia sentit a parlar d'aquestes proteïnes, de manera que el tema ràpidament em va interessar, motiu pel qual vaig decidir tirar-lo endavant.

L'objectiu d'aquest treball és estudiar les aquaporines per tal d'entendre el seu funcionament i conèixer les seves funcions, així com relacionar aquest descobriment amb la criobiologia, el tema que inicialment volia fer.

La part teòrica del treball està dividida en quatre blocs. El primer explica la història d'aquest descobriment i proporciona la informació necessària per entendre què són aquestes proteïnes i quin és el seu funcionament, el segon i tercer expliquen les diverses funcions d'aquestes proteïnes tant en l'aparell reproductor masculí com en l'esperma dels mamífers respectivament, i el quart relaciona la funció de les aquaporines amb la criotolerància del semen.

La part pràctica, en canvi, està dividida en dos grans blocs. El primer consisteix en una visita a un banc de semen per tal d'entendre el funcionament d'aquest i aprendre més sobre la criopreservació del semen i altres teixits biològics com els embrions. Per fer-la vaig anar al Instituto de Reproducción CEFER, on em van fer una breu explicació sobre el funcionament del seu banc de semen i vaig poder realitzar una sèrie de preguntes a [REDACTED], embrióloga del Instituto de Reproducción CEFER.

El segon bloc consisteix en una pràctica al laboratori en la qual el meu objectiu era intentar trobar dues aquaporines específiques en el semen de gos. Per fer-la, vaig anar a la Universitat Autònoma de Barcelona, més concretament, a la Facultat de Veterinària. Allí, en [REDACTED] em va posar en contacte amb la [REDACTED], Doctora en veterinària a la UAB, qui em va ajudar a realitzar la pràctica al laboratori.

A l'hora d'elaborar la part teòrica he trobat certes dificultats ja que, al ser quelcom descobert recentment, no hi havia molta documentació en Internet sobre el tema, així que gran part del meu treball l'he hagut de basar en articles científics. Això ha provocat que en certes ocasions tingués dificultats per entendre la informació donat el nivell de complexitat, o fins i tot, dificultats en les traduccions, ja que gran part d'aquests articles estaven escrits en anglès.

2. LES AQUAPORINES

2.1 Què són?

Les aquaporines són petites proteïnes que es troben en les membranes cel·lulars i que, de manera selectiva, permeten el pas d'aigua i, en alguns casos, altres petites molècules sense càrrega com la urea i el glicerol a través de la membrana.

Per tant, es tracta de canals proteics que juguen un rol vital en el transport d'aigua i altres soluts a través de les membranes biològiques, mantenint així el balanç osmòtic de les cèl·lules i permetent a la cèl·lula regular el seu volum.

A més, aquests canals d'aigua actuen segons el gradient osmòtic, és a dir, la diferència de concentracions a banda i banda de la membrana. Per tant, es tracta de transport passiu, ja que no s'utilitza ATP¹.

Les aquaporines formen part d'una llarga família de proteïnes de membrana, les proteïnes integrals de membrana (MIP); més concretament les anomenades transmembrana, les quals travessen la bicapa lipídica de la membrana cel·lular.

Han estat identificades en tots els organismes vius, des de bacteris i fongs, fins a plantes i animals; i tenen la capacitat de moure fins a tres mil milions de molècules d'aigua per segon, taxes de 10 a 100 vegades majors que per difusió simple².

Tot i que les aquaporines (AQP) són generalment conegudes per la seva alta permeabilitat a l'aigua, també s'ha suggerit la seva implicació en altres funcions cel·lulars, inclosa la permeabilitat de petites molècules diferents de l'aigua, així com la comunicació i adhesió entre dues cèl·lules.

En l'actualitat es coneixen tretze tipus d'aquaporines en els mamífers. A més, una diversitat d'estudis biomèdics i clínics han demostrat que un ampli rang de malalties, entre les quals podem trobar disfunció renal, cataractes i edema cerebral; han estat associades a l'absència d'alguna aquaporina o a alteracions en el seu funcionament, regulació o distribució.

2.2 Història del descobriment

Les membranes biològiques tenen una permeabilitat d'aigua però, a causa de la seva composició lipídica de naturalesa hidrofòbica (repel·lent a l'aigua), aquesta

¹ ATP (trifosfat d'adenosina): molècula que emmagatzema energia

² Pas de petites molècules a través de la membrana plasmàtica a favor del gradient osmòtic.

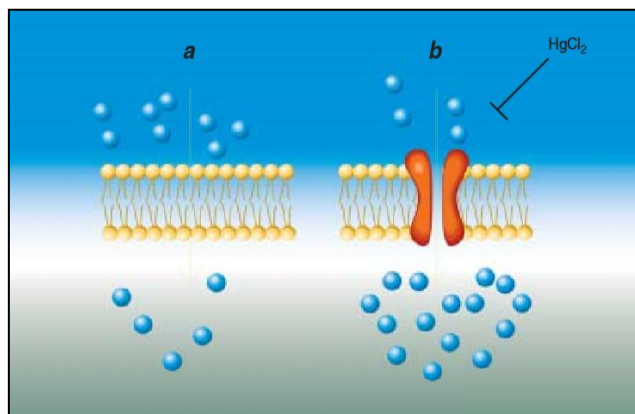
és limitada. De manera que l'aigua pot travessar aquesta estructura per difusió simple, però ho fa de manera lenta i en poques quantitats.

Aquest fenomen de pas d'aigua per difusió passiva és conegut des de molt temps enrere, és més, en aquell moment els científics assumien que el moviment de l'aigua a través de les membranes cel·lulars passava únicament per difusió simple.

Però, la naturalesa anfipàtica³ de la membrana cel·lular dificultava uns elevats índexs de flux d'aigua i, per tant, era difícil d'explicar la permeabilitat a l'aigua d'algunes cèl·lules com els gàmetes o les cèl·lules epitelials renals, cèl·lules en què la permeabilitat d'aigua determinada per un gradient osmòtic era molt més elevada que la permeabilitat d'aigua duta per difusió simple.

Per aquest motiu, Sidel i Salomó (1957) van assumir que l'aigua havia de fluir a través de les membranes cel·lulars mitjançant un altre mecanisme de transport passiu que facilités el flux de l'aigua, donant lloc a la suposició de l'existència de canals d'aigua.

A més a més, en els anys 70 Bob Macy de la Universitat de Berkley, Califòrnia, va descobrir que, tot i que en un principi la difusió passiva d'aigua no era possible de bloquejar, en certes cèl·lules com els eritròcits, el ió mercuri si bloquejava el transport ràpid d'aigua a través de les membranes. Això semblava assenyalar clarament l'existència d'un mecanisme diferent, capaç de facilitar el transport d'aigua.



Imatge 1⁴: Comparació del transport d'aigua per difusió simple (a) i el transport d'aigua a través de les aquaporines (b)

³ Posseeix un extrem hidròfil, és a dir, soluble en aigua, i un extrem hidrofòbic, que rebutja l'aigua.

⁴ ECHEVARRÍA, Miriam; ZARDOYA, Rafael. «Acuaporinas: los canales de agua celulares». *Investigación y Ciencia*, núm. 363, desembre de 2006, p. 60-67

Tot i les múltiples evidències, no va ser fins a finals de la dècada dels 80, quan el laboratori del Dr. Peter Agre, del Departament de Biologia Cel·lular de la Universitat de Johns Hopkins, va descobrir les AQPs per casualitat.

El seu laboratori tenia una beca del N.I.H (Institut Nacional de Salut) per estudiar l'antigen⁵ del grup Rh de la sang. Mentre buscaven aïllar l'antigen del factor Rh sanguini dels humans, el qual té una mida de 32 KDa, una segona proteïna de membrana va ser aïllada, amb una mida de 28 KDa.

Però l'anàlisi estructural de la molècula de 28 kilodalton va revelar que es tractava d'una nova proteïna integral de membrana, sense relació alguna amb la proteïna Rh.

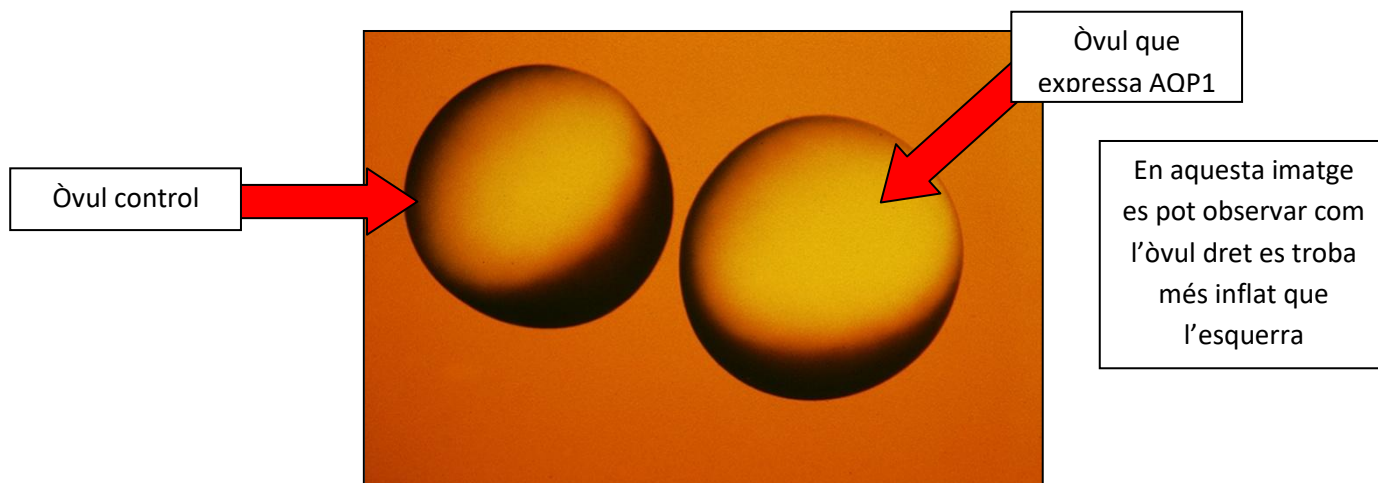
Amb l'objectiu d'entendre aquesta nova proteïna, el Dr. Agre es va reunir amb el Dr. John Parker de la Universitat de Duke. Aquest li va suggerir que podria tractar-se dels canals d'aigua tan buscats.

Per investigar si aquesta hipòtesi era correcta, el Dr. Greg Preston, becari post doctoral del Dr. Agre, va expressar aquesta proteïna en òvuls de granota de l'espècie *Xenopus laevis*, els quals presenten una molt baixa permeabilitat a l'aigua. En exposar els òvuls a un mitjà hipotònic⁶ les diferències entre els que expressaven la proteïna davant dels que no la tenien, anomenats òvuls control, van ser significatives.

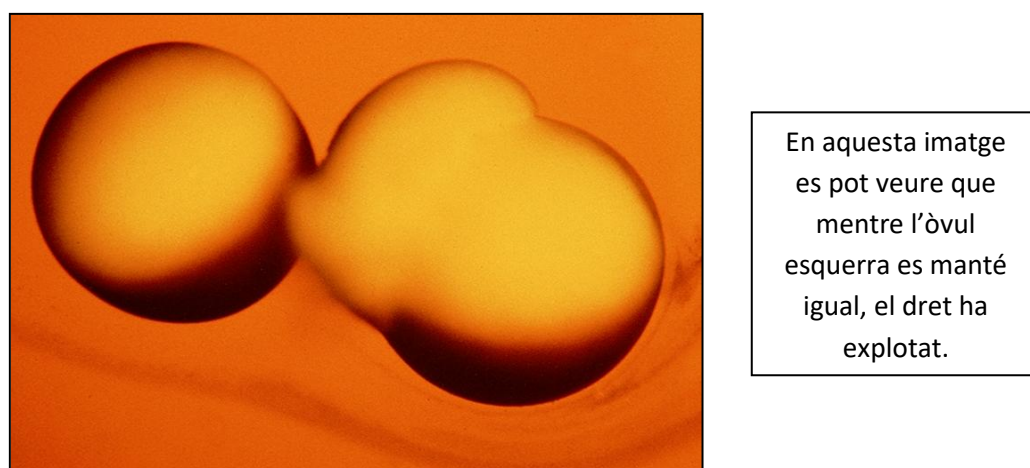
Mentre els òvuls control no van patir cap tipus d'alteració a causa de la baixa permeabilitat a l'aigua; els òvuls que contenien la proteïna es van inflar i van explotar en poc temps, la qual cosa demostrava que exhibien una major permeabilitat a l'aigua.

⁵ Substància capaç de causar una resposta immunitària, és a dir, induir la producció d'anticossos.

⁶ Baix en soluts



Imatge 2⁷: Òvuls 15s després de ser transferits a un medi hipotònic



Imatge 3⁸: Òvuls 3min després de ser transferits a un medi hipotònic

Aquests resultats van confirmar la hipòtesi inicial i aquesta proteïna va ser anomenada CHIP28 (channel-like integral protein of 28 kDa), abreviació de proteïna integral de canal de 28 kDa. De manera que no va ser fins 1992 que es va descobrir la funció d'aquesta proteïna.

L'any 2000, el laboratori de Stroud (University of California, Los Angeles) va aconseguir resoldre la primera estructura d'alta resolució d'una aquaporina per cristal·lografia de raigs X, confirmant moltes de les suposicions fetes. I

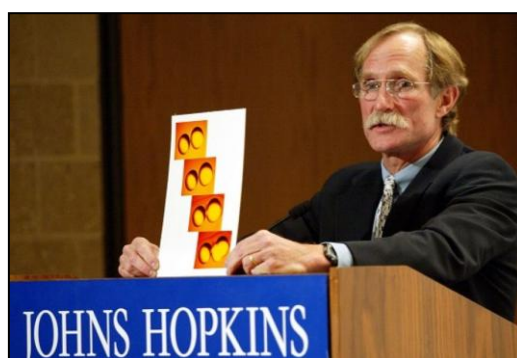
⁷ AGRE, Peter. «The Aquaporin Water Channels». *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 3, núm. 1, març de 2006, p. 5-13

⁸ *Ibidem*

posteriors estudis amb raigs X van permetre observar una estructura més detallada, revelant el funcionament del porus i la seva selectivitat.

Posteriorment a la seva clonació i seqüenciació, fa ser suggerit el nom d'aquaporina-1 (AQP1), de les paraules llatines *aqua*, que significa aigua, i *porus*, que significa passatge; el qual va ser adoptat oficialment per la Human Genome Organization en 1997.

Gràcies a aquest descobriment, Peter Agre va rebre el 2003 el Premi Nobel de Química. I a partir d'aquest moment l' investigació d'aquestes proteïnes ha anat incrementant notablement.



Imatge 4⁹: Peter Agre

En l'actualitat es coneixen gran part de les seves característiques moleculars i funcionals i ja s'han descrit varies proteïnes del mateix tipus, les quals han rebut el mateix nom seguit de un número seqüencial en relació amb la cronologia del descobriment.

2.3 Classificació

En l'actualitat, 13 membres de la família AQP han estat identificats en cèl·lules de mamífers, i es classifiquen en tres grups segons la seva similitud de seqüència d'aminoàcids i la selectivitat del substrat, és a dir, les característiques de permeabilitat. Aquests tres grups són: les aquaporines ortodoxes, les aquagliceroporines (GLPs) i les supraaquaporines.

El primer grup, les ortodoxes, es caracteritza per la seva permeabilitat exclusiva a l'aigua, és a dir, són permeables a l'aigua però no permet el pas d'altres soluts.

⁹ UNIVERSIDAD DEL VALLE. *Este jueves, Primo Nobel de Química en Univalle* [en línia] 19 d'Agost de 2015 <<http://www.univalle.edu.co/lo-que-pasa-en-la-u/premio-nobel-de-quimica-en-univalle>> [Consulta: 10 d'Agost de 2018]

En aquest hi trobem les següents aquaporines: AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 i AQP8.

El segon grup, conegut com aquagliceroporines, està format per quatre aquaporines: AQP3, AQP7, AQP9 i AQP10. Aquestes, tal i com ho diu el seu nom, no només són permeables a l'aigua, sinó també al glicerol, la urea i altres soluts de mida reduïda.

La principal diferència entre les aquaporines del primer grup i les aquagliceroporines és la seva mida de porus. Mentre que les primeres presenten un porus de 2,8 Å, el diàmetre del porus en les aquagliceroporines és de 3,4 Å.

Per últim, AQP11 i AQP12 pertanyen al tercer grup, les superaquaporines, les quals presenten una menor similitud respecte les altres. Aquestes es diferencien dels altres dos grups en la seva seqüència, ja que presenten variacions en el motiu Asparagina-Prolina-Alanina (NPA)¹⁰, ja que l'alanina és substituïda per la cisteïna.

Les superaquaporines són permeables a l'aigua, tot i que l'AQP11 podria tractar-se també d'una aquaporina permeable al glicerol en els humans. A més, aquestes aquaporines també s'expressen dins la cèl·lula, i es troben localitzades en les membranes dels orgànuls intracel·lulars més que en la membrana plasmàtica.

Per tant, tot i que les funcions d'aquest grup d'aquaporines han estat menys investigades que les dels altres dos grups, es creu que estan implicades en el transport intracel·lular d'aigua.

2.4 Estructura

Com totes les proteïnes transmembrana, les aquaporines presenten tres sectors: un sector lipòfil¹¹ i dos sectors hidròfils¹². La superfície de l'aquaporina en contacte amb la bicapa lipídica és rica en aminoàcids hidrofòbics, és a dir, no polars. D'altra banda, la superfície en contacte amb el medi extracel·lular i el medi intracel·lular és rica en aminoàcids polars.

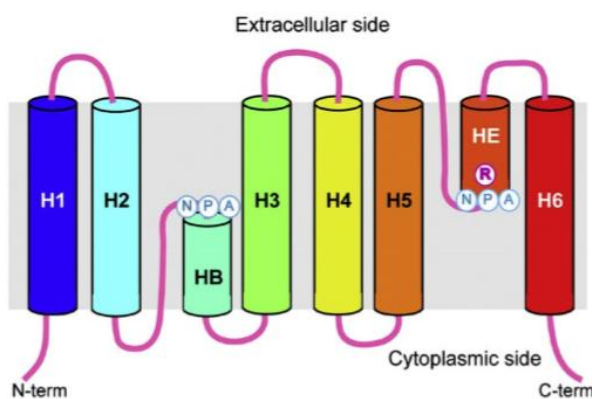
¹⁰ Element conservat en la seqüència d'aminoàcids que habitualment s'associa a una funció concreta, en aquest cas el motiu Asparagina-Prolina-Alanina és necessari per a la selectivitat a l'aigua de les aquaporines.

¹¹ Que té afinitat pels lípids.

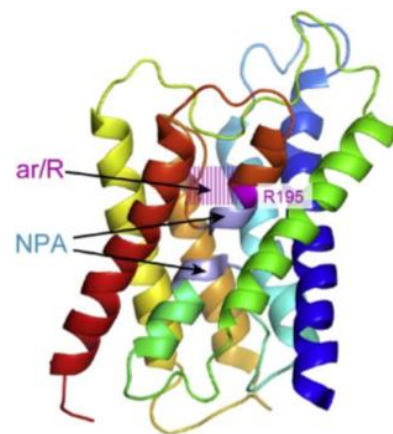
¹² Que té afinitat per l'aigua.

Les aquaporines tenen una grandària relativament petita, la majoria estan compostes d'una cadena polipeptídica de menys de 300 aminoàcids, normalment de 250 a 290.

Totes les AQPs presenten una similitud estructural bastant notable. Estan formades per sis α -hèlixs hidrofòbiques (H1, H2, H3, H4, H5 i H6) lleugerament inclinades cap a la dreta que travessen la membrana de costat a costat, i dues semi hèlixs (HB i HE). Aquestes α -hèlixs estan connectades per tres bucles extracel·lulars i dos intracel·lulars.



Imatge 5¹³: Estructura de l'aquaporina estesa



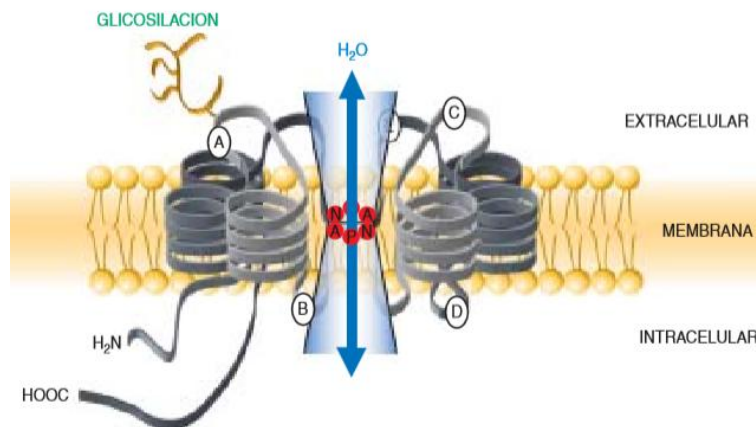
Imatge 6¹⁴: Aquaporina replegada

A més, totes les AQPs presenten seqüències molts semblants d'aminoàcids a la primera i en la segona meitat de la cadena polipeptídica. De manera que estan conformades per dues meitats casi iguals entre si, de tres α -hèlixs cadascuna, unides per el bucle entre H3 i H4 (vegeu la imatge 5). Aquestes dues meitats es pleguen sobre si mateixes formant el porus aquós.

L'estructura resultant és un túnel estret en el centre de la molècula, amb una zona central estreta que s'eixampla obrint-se cap a les cares extracel·lulars i intracel·lulars en forma d'embut. Aquest model es va anomenar "rellotge de sorra", per la semblança amb aquest.

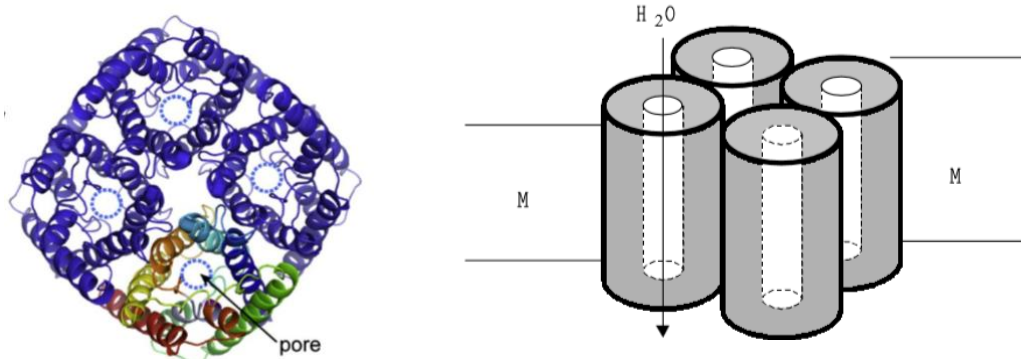
¹³ YESTE, M; MORATÓ, R; RODRÍGUEZ-GIL, JE; BONET, S; PRIETO-MARTÍNEZ, N. «Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology». *Reproduction in domestic animals*, vol. 52, núm. 4, octubre de 2017, p. 12-27

¹⁴ Ibídem



Imatge 7¹⁵: Model rellotge de sorra

Encara que cada aquaporina forma per si sola un canal funcionalment independent, els estudis estructurals han revelat que les aquaporines s'uneixen en grups de quatre formant tetràmers a les membranes cel·lulars. Sembla ser que l'estructura tetramèrica confereix als monòmers una major estabilitat en l'entorn lipídic de la membrana.



Imatges 8¹⁶ i 9¹⁷: Estructura tetramèrica

2.5 Permeabilitat

Pel que fa a la permeabilitat, les aquaporines són altament selectives al pas de l'aigua, els ions i soluts amb càrrega elèctrica no poden passar a través d'aquest canal. Això és molt important, ja que el pas de protons a través del porus

¹⁵ ECHEVARRÍA, Miriam; ZARDOYA, Rafael. «Aquaporinas: los canales de agua celulares». *Investigación y Ciencia*, núm. 363, desembre de 2006, p. 60-67

¹⁶ YESTE, M; MORATÓ, R; RODRÍGUEZ-GIL, JE; BONET, S; PRIETO-MARTÍNEZ, N. «Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology». *Reproduction in domestic animals*, vol. 52, núm. 4, octubre de 2017, p. 12-27

¹⁷ SÁNCHEZ, Julio César. «Aquaporinas: proteínas mediadoras del transporte de agua». *Colombia Médica*, vol. 34, núm. 4, 2003, p. 220-227

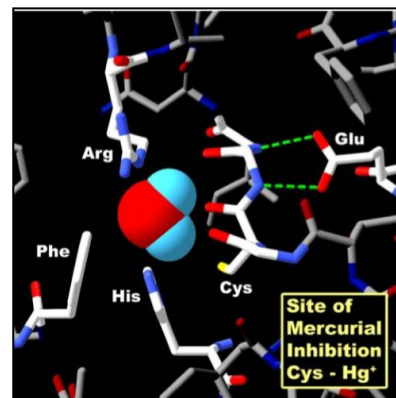
alteraria el gradient electroquímic de la cèl·lula, el qual és important per a l'emmagatzematge d'energia.

Per prevenir el pas de substrats grans l'aquaporina presenta una limitació física: el diàmetre del porus. La regió més estreta del porus té un diàmetre de 3 Å, una mica més gran que el diàmetre de la molècula d'aigua, de 2'8 Å. De manera que les molècules d'aigua han de travessar d'una en una el canal, i el porus sol permet travessar substrats la mida dels quals és menor a 3 Å, impedit el pas d'ions i altres soluts més grans.

Però, les diferents aquaporines presenten diferències en la seva seqüència, de manera que la grandària del por que en resulta difereix d'una aquaporina a una altra. Així, la grandària del por que en resulta afecta directament al tipus de substrats que el poden travessar, tal com succeeix amb les aquagliceroporines.

D'altra banda, per prevenir la permeabilitat d'ions petits i protons, l'aquaporina presenta dues estructures: els dos motius NPA situats al final de les hèlix curtes HB i HE, i el lloc de constricció ar/R (the aromatic/arginine selectivity filter).

L'ar/R forma la regió més estreta del porus, anomenada anteriorment, d'un diàmetre de 3 Å. El lloc de constricció ar/R està format per Arginina 195, Histidina 180, Fenilalanina 56 i Cisteïna 189. L'Arg195 i l'His180, al tractar-se d'aminoàcids polars amb càrrega positiva, creen una repulsió electrostàtica que impedeix el pas de cations com per exemple l'aigua protonada (H_3O^+).



Imatge 10¹⁸: Lloc de constricció ar/R

També cal recalcar la importància de dos aminoàcids que formen part de l'ar/R. L'aminoàcid Cys189, ja que és el lloc per a la inhibició per mercuri. I l'aminoàcid His180, ja que en les aquagliceroporines no està present, en canvi és substituït per Glicina, la qual cosa provoca un diàmetre de porus major permetent el pas d'altres soluts com el glicerol i la urea.

Pel que fa als motius NPA, aquests tenen un paper molt important a l'hora d'impedir el pas de protons.

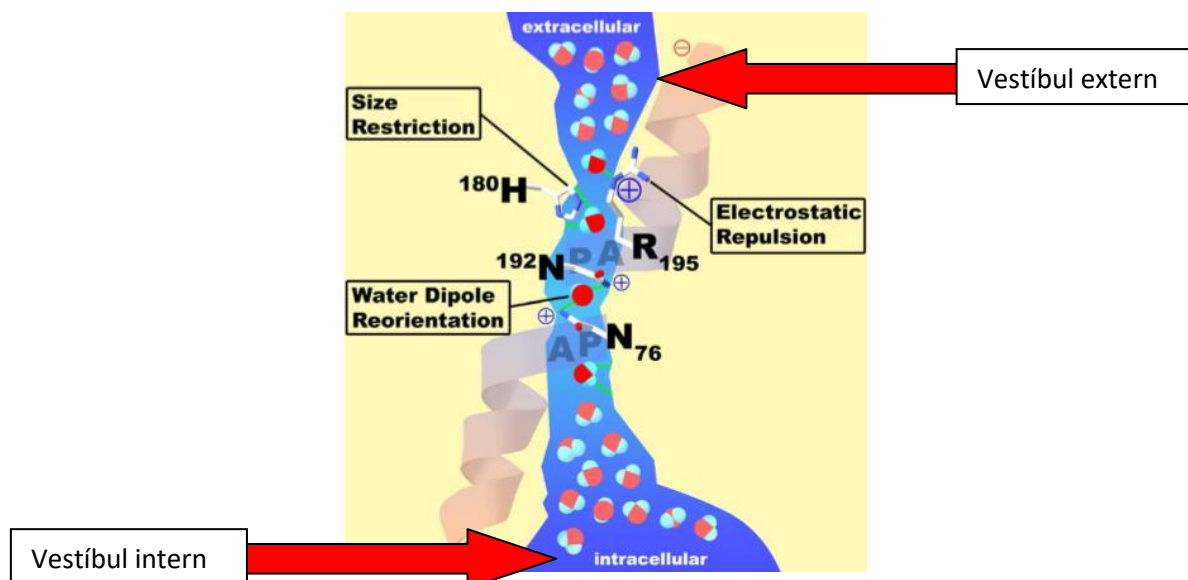
¹⁸ AGRE, Peter. «The Aquaporin Water Channels». *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 3, núm. 1, març de 2006, p. 5-13

Tal i com ho mostra l'estructura del rellotge de sorra, l'aquaporina presenta un vestíbul extern i un vestíbul intern on l'aigua es troba a granel. En la solució a granel, com que les molècules d'aigua es troben a prop les unes amb les altres, es produeixen enllaços d'hidrogen entre aquestes, permetent així la lliure circulació de protons saltant entre les molècules, la qual cosa es coneix com a "efecte Grotthus".

Però, el centre de l'aquaporina té un recorregut d'aproximadament 20 Å on l'aigua transita el porus molècula a molècula a causa del petit diàmetre del porus. I, per impedir que els protons travessin el porus mitjançant l'efecte Grotthus, en el centre de l'aquaporina hi troben dos motius NPA juxtaposats, un per a cada meitat de l'aquaporina, característics de totes les aquaporines.

Els motius NPA són dos segments proteics que contenen la seqüència Asparagina-Prolina-Alanina. Aquestes dues asparagines, al tractar-se d'aminoàcids polars, formen enllaços d'hidrogen amb les molècules d'aigua que passen. Això produeix una reorientació d'aquestes molècules, evitant les interaccions entre una molècula i la següent, la qual cosa elimina la possibilitat del transport de protons a través dels enllaços d'hidrogen.

A més, al no estar enllaçades unes molècules amb les altres, proporciona un mecanisme molt interessant que permet que l'aigua es mogui sense resistència, obtenint com a resultat un flux molt ràpid.



Imatge 11¹⁹: Pas de l'aigua a través de l'aquaporina

¹⁹ AGRE, Peter. «The Aquaporin Water Channels». Proceedings of the American Thoracic Society, vol. 3, núm. 1, març de 2006, p. 5-13

2.6 Regulació

Les aquaporines poden ser activades o desactivades per diferents mecanismes de regulació.

Entre aquests trobem la fosforilació, sobretot de residus de serina i treonina (aminoàcids proteics). Aquesta consisteix en la transferència o unió d'un grup fosfat a qualsevol altra biomolècula. I en aquest cas és principalment duta a terme per la proteïna cinasa A (PKA), un enzim que actua com transductor de senyals, modificant altres proteïnes al transferir-les un grup fosfat.

D'altra banda, els canvis de pH afecten la conformació de les aquaporines, modificant així la seva activitat o permeabilitat, de manera que també és considerat un mecanisme de regulació de les aquaporines.

Un exemple n'és l'AQP0, la qual s'activa amb pH baix, és a dir, àcid. O l'AQP3, que al contrari de l'AQP0, la seva activitat és inhibida amb pH baix.

A més, metalls pesants com el mercuri, el níquel o el coure poden afectar l'activitat d'algunes aquaporines com per exemple l'AQP1, l'AQP2, l'AQP3 i l'AQP8. Però no de totes, com és el cas de l'AQP7.

En les cèl·lules eucariotes, entre els factors que regulen l'obertura i tancament de les aquaporines també en podem trobar altres com l'osmolaritat, la unió amb altres molècules o els estímuls hormonals (com és el cas de l'AQP9, la qual es regulada per estrògens).

3. LES AQP EN L'APARELL REPRODUCTOR MASCULÍ DELS MAMÍFERS

3.1 Aparell reproductor masculí dels mamífers

L'aparell reproductor masculí és un conjunt d'òrgans sexuals que treballen de manera conjunta per tal de produir i alliberar els gàmetes masculins i les secrecions que els acompanyen.

L'aparell reproductor masculí està constituït per:

3.1.1 Els testicles

El testicle és la gònada masculina. Es tracta de dues glàndules de forma arrodonida que presenten dues funcions: produir els espermatozoides i produir hormones sexuals masculines.

Estan situats dins d'unes bosses que coneixem amb el nom de bosses escrotals o escrots.

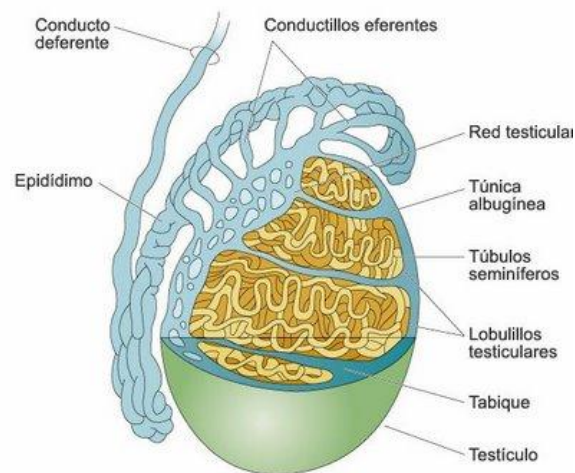
Dins els testicles trobem uns llargs conductes molt replegats, els conductes seminífers, i les cèl·lules de Leydig, cèl·lules intersticials que estan entremig dels conductes seminífers i produeixen les hormones sexuals masculines que estimulen l'espermatogènesi²⁰.

Túbuls seminífers

Els espermatozoides es generen en els túbuls seminífers contornejats.

Aquests túbuls seminífers es continuen per una porció curta i recta, els túbuls seminífers rectes, que desemboquen a una xarxa localitzada en el centre del testicle (Rete testis) que va a parar a l'epidídim a través dels conductes eferents.

²⁰ Producció d'espermatozoides.



Imatge 12²¹: Estructura interna d'un testicle

Cèl·lules de Sertoli

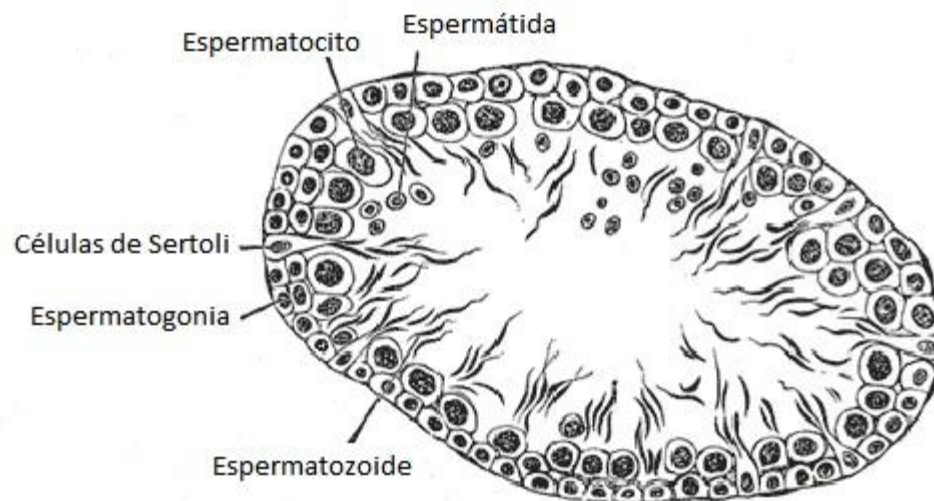
Les cèl·lules de Sertoli són un tipus de cèl·lules que es situen en els tubuls seminífers i proporcionen suport nutricional i estructural a les cèl·lules germinals en desenvolupament dins de l'epiteli seminífer. A més, durant l'espermatogènesi es produeixen una sèrie de restes cel·lulars que han de ser fagocitats²² per les cèl·lules de Sertoli.

Les unions estretes entre les cèl·lules de Sertoli permeten crear una barrera que serveix per assegurar un microambient ideal per a les cèl·lules germinals, evitant que substàncies no desitjades puguin arribar fins a aquestes i evitant que el sistema immunitari pugui accedir i reconèixer a les noves cèl·lules com a un possible antigen, i que vulgui destruir-les. Però, com que aquesta barrera manté a les cèl·lules germinals aïllades, les cèl·lules de Sertoli els hi ha de proporcionar aliments.

Les cèl·lules de Sertoli també tenen una important funció secretora de substàncies hormonals necessàries per a l'espermatogènesi. A més, també s'encarreguen de la regulació de la funció de les cèl·lules de Leydig.

²¹ GLUTS. *Cirugía para quiste del epidídimo* [en línia] 19 de desembre de 2011 <<http://delalinearectadelmarmacodelapuerta.blogspot.com/2011/12/cirugia-para-quiste-del-epididimo.html>> [Consulta: 25 d'Octubre de 2018]

²² Fagocitar: capturar i digerir partícules sòlides, rodejant-les amb la seva membrana citoplasmàtica i introduint-les en l'interior cel·lular per tal d'assimilar-les i destruir-les.



Imatge 13²³: Interior d'un túbul seminífer

3.1.2 Vies espermàtiques

Epidídim

Els epidídim són dos òrgans localitzats a la superfície dorsal del testicle on s'emmagatzemen un 55-65% del total d'espermatozoides.

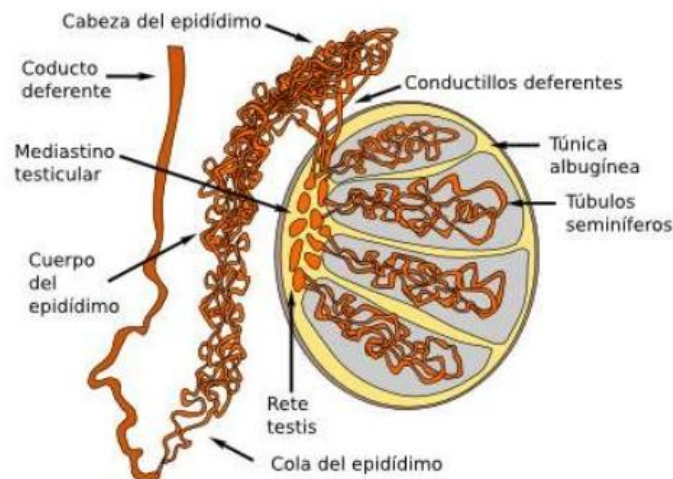
L'epidídim està constituït per tres regions: el segment inicial o caput, el cos o corpus i la cua o cauda:

- Caput: rep els espermatozoides dels conductes eferents, és el lloc on aquests maduren.
- Corpus: serveix com emmagatzematge d'espermatozous.
- Cauda: emmagatzema espermatozous i participa en l'absorció fluida per concentrar l'esperma.

El cap està constituït per els conductes eferents que desemboquen al conducte del epidídim. Els conductes eferents connecten els testicles amb l'epidídim.

El cos i la cua estan formats pel conducte del epidídim, molt recargolat, a on els espermatozoides maduren i adquireixen mobilitat.

²³ CIENCIA TODAY. ¿Qué son las células de Sertoli? [en línia] Elena Verger Salom. 24 d'Agost de 2017 <<https://cienciatoday.com/celulas-sertoli/>> [Consulta: 23 d'Octubre de 2018]



Imatge 14²⁴: Representació del testicle unit a l'epidídim

Conductes deferents

Els conductes deferents són dos tubs que comuniquen els testicles amb la uretra, transportant els espermatozoides des dels epidídim fins les vesícules seminals.

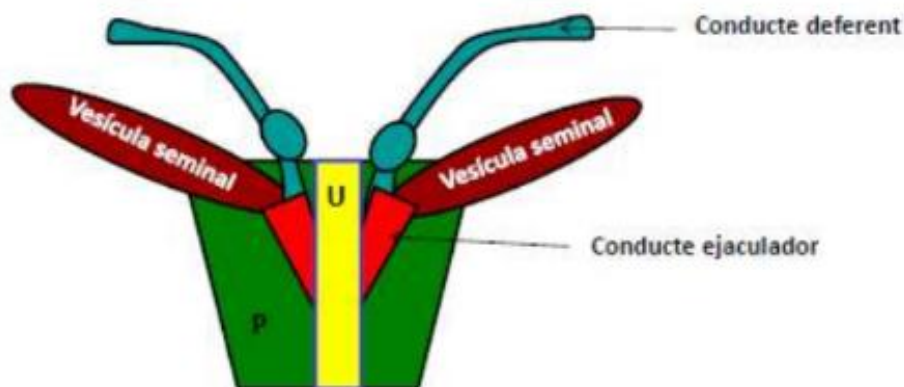
Els conductes deferents continuen el conducte de l'epidídim a nivell de la cua, acaben unint-se als conductes de drenatge de les vesícules seminals i formen els conductes ejaculadors.

Conductes ejaculadors

Els conductes de drenatge de les vesícules seminals s'uneixen als conductes deferents per formar els conductes ejaculadors, que acaben a la uretra.

A partir dels conductes ejaculadors la uretra té doble funció, abans només tenia la funció de l'orina, i ara també transporten semen.

²⁴ SLIDESHARE. *Complejo reproductivo masculino* [en línia] Luis G. Perez. 20 de novembre de 2014 <<https://es.slideshare.net/AnclesPerez/histologia-del-complejo-reproductivo-masculino>> [Consulta: 18 d'Octubre de 2018]



Imatge 15²⁵: Representació de les vies espermàtiques

Uretra

Conducte comú entre l'aparell reproductor masculí i l'aparell urinari.

3.1.3 Glàndules annexes

Vesícules seminals

Situades a ambdós costats a la vora posterior de la bufeta urinària.

Estan constituïdes per un únic túbul llarg, molt recargolat i dilatat, que té el seu origen embrionari en el conducte deferent.

Són dues glàndules que secreten el líquid seminal, un líquid viscos i blanquinós que permet als espermatozoides nedar.

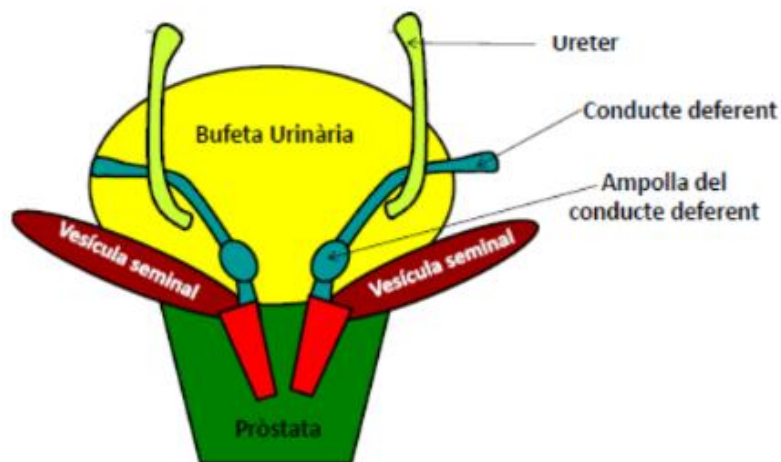
Pròstata

És la glàndula accessòria més gran, la qual rodeja la uretra.

Secreta el líquid prostàtic (que estimula els espermatozoides), aquest és abocat als conductes deferents.

La barreja formada pels espermatozoides, el líquid seminal i el líquid prostàtic constitueix el semen. Les secrecions de la pròstata constitueixen la major part del semen, un 20% del volum del semen.

²⁵ STUDOCU, Anatomia (UAB). *Aparell reproductor masculí* [en línia] <<https://www.studocu.com/es/document/universitat-autonoma-de-barcelona/anatomia/apuntes/aparell-reproductor-masculi/2403617/view>> [Consulta: 18 d'Octubre de 2018]



Imatge 16²⁶: Representació de la pròstata i les vesícules seminals

Glàndules de Cowper

Són dues petites glàndules de la grandària d'un pèsol que segreguen una mucositat lubricant que neteja i lubrica la uretra abans i durant l'ejaculació.

3.1.4 Genitals externs

Bosses escrotals

L'escrot és la bossa que conté els testicles, epidídim i la part inicial dels conductes deferents. Està situat a la part inferior de la pelvis.

Les dues bosses s'uneixen a la línia mitja i formen el rafe escrotal, que continua per davant a la cara ventral del penis i per darrere amb el perineu.

L'escrot permet que els testicles estiguin a una temperatura de 2 a 4°C inferior a la temperatura corporal, la qual cosa és necessària per la formació dels espermatozoides.

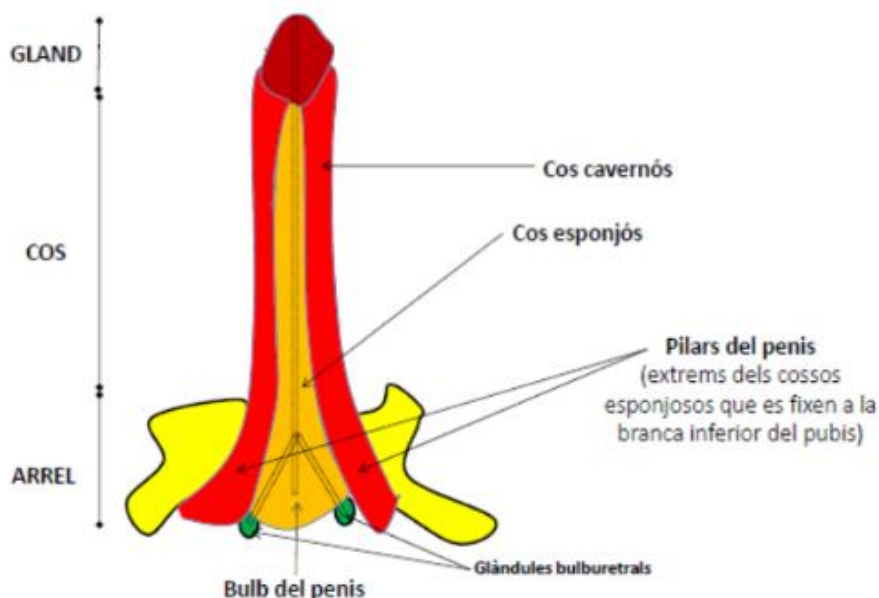
Penis

El penis és un òrgan musculós situat a l'exterior del cos, és l'òrgan copulador masculí. Està travessat per la uretra.

El penis es divideix en tres parts:

²⁶ STUDOCU, Anatomia (UAB). *Aparell reproductor masculí* [en línia] <<https://www.studocu.com/es/document/universitat-autonoma-de-barcelona/anatomia/apuntes/aparell-reproductor-masculi/2403617/view>> [Consulta: 18 d'Octubre de 2018]

- Arrel: la part unida al pubis. Està constituïda per 3 masses de teixit erètil que produeixen l'erecció al contraure's.
- Cos: entre l'arrel i el gland. Està format per dos cossos cavernosos i un cos esponjós.
- Gland: és l'eixamplament del cos esponjós. És una zona molt vascularitzada, recoberta per una pell fina anomenada prepuci.



Imatge 17²⁷: Estructura del penis

3.2 Formació, maduració i capacitació del semen

L'espermatoïtogenesis és la formació dels espermatozoides al testicle, més concretament a les parets dels túbuls seminífers, a partir de cèl·lules somàtiques germinatives (cèl·lules diploides²⁸) que segueixen un procés de divisió per meiosi donant lloc als gàmetes (cèl·lules sexuals haploides²⁹).

L'espermatoïtogenesis consta de quatre fases. La primera fase és la fase de proliferació o multiplicació, durant aquesta les cèl·lules germinals (2n) situades dins dels túbuls seminífers dels testicles, es multipliquen mitjançant la mitosi i formen els espermatogonis (2n).

²⁷ STUDOCU, Anatomia (UAB). *Aparell reproductor masculí* [en línia] <<https://www.studocu.com/es/document/universitat-autonoma-de-barcelona/anatomia/apuntes/aparell-reproductor-masculi/2403617/view>> [Consulta: 18 d'Octubre de 2018]

²⁸ Cèl·lula o organisme que presenta dos jocs de cromosomes homòlegs. Es representa amb 2n.

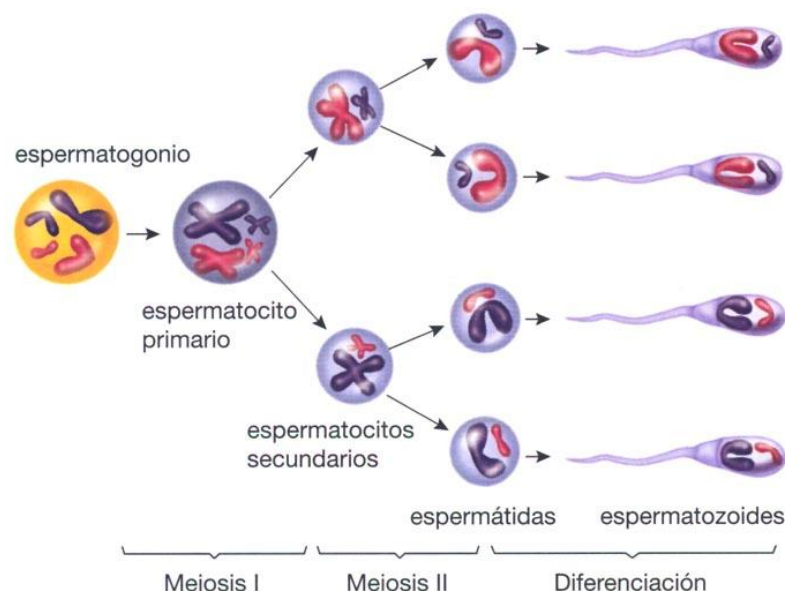
²⁹ Cèl·lula o organisme amb un únic joc de cromosomes. Es representa amb n.

La segona fase és l'anomenada fase de creixement. En aquesta, els espermatogonis anteriorment formats augmenten de mida i es converteixen en cèl·lules més grans, anomenades espermatòcits de primer ordre ($2n$).

Seguidament es produeix la fase de maduració, en la qual cada espermatòcit de primer ordre experimenta una meiosi donant lloc en la primera divisió a dos espermatòcits de segon ordre (n), que es dividiran originant quatre espermatides (n). Encara que es tracta de cèl·lules haploides, les espermatides són molt semblants a les cèl·lules precursors en les primeres etapes de l'espermatogènesi, amb forma rodona, nucli central i gran quantitat de citoplasma.

I, l'última fase de l'espermatogènesi és la fase d'espermioogènesi. Aquesta consisteix en un procés de diferenciació en el qual les espermatides experimenten un seguit de transformacions fins a transformar-se en espermatozoides.

Durant aquesta fase es produeix un allargament de les espermatides, fins que el flagel està totalment format, i una reducció de gran part del citoplasma cel·lular, alliberant un cos residual que més tard serà fagocitat per les cèl·lules de Sertoli. Al final de l'espermioogènesi el cap, la peça intermèdia i el flagel estan ben diferenciats, de manera que ja tenim un espermatozoide.



Imatge 18³⁰: Procés de l'espermatogènesi

³⁰ MORFOEXPRESS. *Espermatogènesi* [en línia] Sadler Langman Jan. 2012
<<https://morfoexpress.wordpress.com/espermatogenesis/>> [Consulta: 20 d'Octubre de 2018]

Durant aquest procés de formació d'espermatozoides, la sortida de l'aigua de les cèl·lules de Sertoli és molt important, ja que controla el flux del túbul seminífer per crear un ambient adequat per a les cèl·lules precursors.

A més a més, el moviment de fluids en les cèl·lules germinals durant la fase d'espermogènesi també és important, ja que es produeix una reducció dràstica del citoplasma i una condensació de la cromatina³¹.

Finalment, els espermatozoides ja ben diferenciats s'alliberen al llum tubular i es mouen al llarg d'una sèrie de conductes, els conductes eferents, fins arribar a una estructura anomenada epidídim, on es concentren i inicien el procés de maduració.

Els espermatozoides, no funcionals encara, entren al capdavant de l'epidídim i es mouen a causa de la contracció dels músculs llisos que revesteixen els tubs de l'epidídim. A mesura que es mouen al llarg de l'epidídim, els espermatozoides van madurant i adquirint la capacitat de moure's. Capacitat que, una vegada dins l'aparell reproductor femení, utilitzaran per moure's de forma independent cap a l'òvul no fertilitzat.

Aquest procés de maduració implica modificacions en la composició de la membrana plasmàtica del flagel i la regulació del moviment de fluids en el llum de l'epidídim, ja que la reabsorció d'aigua augmenta la concentració d'espermatozoides i proteïnes, creant un microambient hipertònic necessari per a l'activació de la motilitat de l'esperma una vegada alliberat de l'epidídim.

Per tant, el control de la composició de fluids del llum de l'epidídim per part de les cèl·lules de Sertoli i dels conductes eferents i epidídims també és essencial per al transport, la maduració i la concentració dels espermatozoides. I una interrupció d'aquest procés podria produir un entorn anormal inadequat per a la concentració i maduració d'espermatozoides, perdent així la fertilitat.

Tot i així, la maduració dels espermatozoides encara no és completa ja que encara no poden fertilitzar l'òvul. Els espermatozoides més madurs s'emmagatzemen a la cauda dels epidídims (la cua) fins que es produeix l'ejaculació.

Durant l'ejaculació, les fibres musculars que els rodegen es contreuen, expulsant així el major número d'espermatozoides possibles de l'epidídim a

³¹ Material genètic de la cèl·lula eucariota en interfase, és a dir, quan no s'està duent a terme la duplicació cel·lular.

través del conductes deferents per tal d'arribar a l'exterior. A mesura que aquests passen a través dels conductes deferents, es barregen amb les secrecions produïdes per la vesícula seminal associada, una glàndula que aporta fructosa i proteïnes.

El fluid, que ara conté tant espermatozoides com secrecions de les vesícules seminals, es trasllada al conducte ejaculador (una estructura formada per la unió dels vasos deferents i el conducte de la vesícula seminal). Els conductes ejaculadors transporten el fluid seminal a la pròxima estructura, la pròstata, on s'agreguen secrecions de la glàndula per formar el semen, secrecions que ajuden a l'esperma a recórrer la uretra i l'aparell reproductor femení.

A continuació, com que el semen és expulsat per la uretra durant la ejaculació, les dues glàndules glàndules de Cowper alliberen un fluid espès i salat que lubrica el final de la uretra i la vagina, i ajuda a netejar els residus d'orina de la uretra del penis per protegir els espermatozoides al passar.

Finalment, després que el semen sigui ejaculat i entri en contacte amb els diferents fluids de l'aparell reproductor femení, es produeix un procés anomenat capacitació espermàtica. En aquest, l'espermatozoide pateix un conjunt de canvis fisiològics per tal d'adquirir la capacitat de fecundar l'òvul, acabant de madurar del tot. Principalment pateixen canvis en la membrana plasmàtica que augmenten la seva fluïdesa i, prop de l'òvul, adquireixen una vigorosa activitat de natació, la fase d'hiperactivació.

Cal destacar que quan l'esperma entra en l'aparell reproductor femení, l'osmolaritat de l'ambient és menor que la de l'aparell reproductor masculí. Per tant, pateix un lleu canvi osmòtic que, tot i ser necessari per activar la motilitat dels espermatozoides, ha de ser regulat amb precisió per evitar que els espermatozoides s'unflin o s'encongeixin afectant així la seva integritat i funció.

3.3 Localització de les aquaporines

La localització d'aquaporines en els diferents òrgans reproductors masculins s'ha investigat en diverses espècies, ja que la presència i localització d'aquestes proteïnes varia d'una espècie a una altra.

De moment ja s'han localitzat la majoria de les aquaporines (excepte l'AQP6 i l'AQP12) en els diferents òrgans de l'aparell reproductor masculí dels mamífers.

A continuació hi ha un recull de les diverses aquaporines detectades en els aparells reproductors masculins de diferents mamífers estudiats fins el moment.

AQP	Organ	Species	Reference
AQP0	Sertoli and Leydig cells. Not present in efferent ducts or epididymis	Rat	Hermo et al. (2004)
AQP1	Epithelial cells of the rete testis, non-ciliated cells of the efferent ducts, epididymis, vas deferens, prostate and seminal vesicles	Mouse	Lu et al. (2008); Zhou et al. (2001)
	Non-ciliated (microvilli and basolateral plasma membrane domain) and ciliated cells (cilia) of the efferent ducts. Endothelial cells of blood vessels the efferent ducts and epididymis	Rat	Badran and Hermo (2002); Brown et al. (1993); Oliveira et al. (2005)
	Apical region of epithelial cells in the initial epididymal segment and microvilli of principal cells in the caput	Sheep	Schimming et al. (2015)
	Spermatids, epithelial cells of the efferent ducts and endothelial cells of blood vessels	Bats	Oliveira et al. (2013)
	Microvilli of the efferent ducts	Golden Syrian hamster	Ford et al. (2014)
	Apical surface of non-ciliated cells of the efferent ducts, smooth muscle layer of the vas deferens and endothelial cells of blood vessels	Buffalos	Arrighi et al. (2016)
	Apical surface of the non-ciliated cells in the efferent ducts, endothelial cells of blood vessels and in smooth muscle layer of arteries	Cat	Arrighi, Aralla et al. (2010); Arrighi and Aralla (2014)
AQP2	Testis, principal cells of epididymal corpus and cauda and vas deferens	Rat	Arrighi, Aralla et al. (2010); Da Silva et al. (2006); Stevens et al. (2000)
	Leydig cells, spermatids and principal cells of the epididymis	Horse	Klein et al. (2013)
	Principal epididymal cells from corpus to cauda and vas deferens epithelium	Cat	Arrighi, Ventriglia et al. (2010); Arrighi and Aralla (2014)
AQP3	Basal cells of the epididymis	Rat	Hermo et al. (2004).
AQP5	Apical membrane of principal epididymal cells of corpus and cauda (but not in the caput)	Rat	Da Silva et al. (2006)
	Not found	Cats	Arrighi, Aralla et al. (2010); Arrighi and Aralla (2014)
AQP7	Germ cells (testis) and epididymis	Rat	Calamita, Mazzone, Bizzoca et al. (2001); Calamita, Mazzone, Cho et al. (2001); Da Silva et al. (2006); Hermo and Smith (2011); Ishibashi et al. (1997)
AQP7	Epididymis and vas deferens	Dog	Domeniconi et al. (2008)
AQP8	Sertoli cells	Rat	Badran and Hermo (2002); Calamita, Mazzone, Bizzoca et al. (2001); Calamita, Mazzone, Cho et al. (2001)
AQP9	Leydig cells, microvilli of non-ciliated cells in the efferent duct and of principal cells of all epididymal regions, clear epididymal cells of the cauda, vas deferens and prostate	Rat Human	Badran and Hermo (2002); Belleannée et al. (2009); Da Silva et al. (2006); Oliveira et al. (2005); Pastor-Soler et al. (2001); Pietrement et al. (2008); Wellejus et al. (2008)
	Microvilli of the efferent ducts	Golden Syrian hamster	Ford et al. (2014)
	Nuclei of the epithelial cells of the initial segment, caput and corpus, and in the plasma membrane of cauda epithelial cells	Sheep	Schimming et al. (2015)
	Principal cells of the epididymis	Horse	Klein et al. (2013)
	In pre-pubertal pigs, it is present in the apical region of epithelial cells in caput and corpus epididymis. In post-pubertal boars, it is found in the nuclei of epithelial cells of all epididymal regions and in the apical region of cauda epididymal cells	Pigs	Schimming et al. (2017)
	Stereocilia of the principal cells of all epididymal regions and in the efferent ducts. Not found in the testis	Bat	Castro et al. (2017); Oliveira et al. (2013)
	Apical surface of non-ciliated cells of the efferent ducts, epididymis and in the initial segment of the vas deferens	Dogs	Domeniconi et al. (2007)

AQP9	Principal cells of epididymal corpus and cauda, and of the vas deferens, with significantly reduced immunoreactivity during the non-mating season	Buffalo	Arrighi et al. (2016)
	Apical and lateral regions of both ciliated and non-ciliated cells of the efferent ducts	Cat	Arrighi, Ventriglia et al. (2010); Arrighi and Aralla (2014)
AQP10	Microvilli of non-ciliated cells and cilia of ciliated cells of the efferent ducts and endothelium of blood vessels	Rat	Hermo et al. (2004)
AQP11	Epididymal epithelial cells	Rat	Da Silva et al. (2006); Yeung and Cooper (2010)

Imatge 19³²: Localitzacions de les AQP en l'aparell reproductor masculí dels mamífers

3.4 Funcions de les aquaporines

Tal com hem pogut veure, l'homeòstasi fluida durant l'espermatogènesi i la maduració de l'esperma és crítica per a la fertilitat masculina. De manera que, com que la funció de les aquaporines és el transport ràpid d'aigua, es creu que les aquaporines podrien jugar un paper crucial d'absorció i secreció al llarg de l'aparell reproductor masculí.

Per aquest motiu, a partir de les localitzacions de les aquaporines descobertes s'ha estat estudiant el paper d'aquestes i s'han suggerit diverses funcions que les aquaporines podrien exercir al llarg de l'aparell reproductor masculí dels mamífers.

3.4.1 Dades a destacar

El 2004 es va localitzar AQP0 a les cèl·lules Sertoli i Leydig dels testicles de rates però, cal esmentar que es van detectar unes variacions en l'expressió d'aquesta proteïna a les cèl·lules de Sertoli segons la etapa de l'epiteli seminífer que suggerien que l'AQP0 juga un paper important durant l'espermatogènesi de rates. Però, com que en l'any 2013 es va detectar AQP0 en les cèl·lules Leydig dels cavalls però no en les de Sertoli, es creu que el paper que aquesta aquaporina exerceix durant l'espermatogènesi varia entre espècies.

D'altra banda, tot i que les localitzacions de l'AQP1 varien entre espècies, la majoria d'estudis suggereixen que aquesta proteïna està implicada en l'absorció de fluid testicular en els conductes eferents.

Pel que fa a l'AQP2, aquesta ha estat detectada en la cauda dels epidídim de mascles joves de rata, però no d'adults. A causa d'això, es creu que aquesta aquaporina no sols participa en els processos d'absorció i secreció de l'epidídim, sinó també en el seu desenvolupament postnatal.

³² YESTE, M; MORATÓ, R; RODRÍGUEZ-GIL, JE; BONET, S; PRIETO-MARTÍNEZ, N. «Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology». *Reproduction in domestic animals*, vol. 52, núm. 4, octubre de 2017, p. 12-27

A més, el fet que aquesta proteïna hagi estat identificada en els vasos deferents i en el corpus i cauda dels epidídims de la majoria de les espècies estudiades suggereix que podria estar implicada en el manteniment de l'ambient adequat per a la maduració dels espermatozoides en els epidídims.

Respecte a les localitzacions de l'AQP7, aquesta aquaporina es va trobar per primera vegada en l'epiteli dels túbuls seminífers dels testicles de rata, i es va suggerir que tenia un paper rellevant en la reducció del citoplasma durant l'espermatogènesi.

Com que l'AQP8 es troba present en les cèl·lules Sertoli i cèl·lules germinals de les rates, també es creu que podria estar implicada en la reducció del citoplasma duran l'espermatogènesi.

Tanmateix, el fet que models transgènics³³ de ratolins amb l'AQP7 o l'AQP8 nul·les segueixin sent fèrtils o no mostrin un fenotip evident suggereix que les aquaporines podrien compensar-se entre elles, alterant així els resultats obtinguts en les investigacions amb models KO³⁴.

Referent a l'AQP9, aquesta aquaporina és la més abundant en l'aparell reproductor masculí dels mamífers. Ha estat identificada principalment en els epidídims, i s'ha suggerit que podria participar en l'absorció i secreció de fluids així com en el transport de soluts al llarg de les vies espermàtiques.

Cal destacar que en el búfal s'han trobat variacions en la presència de l'AQP9 en el corpus i cauda dels epidídims com també en els vasos deferents segons si és temporada d'aparellament o no, ja que la quantitat d'AQP9 és més elevada en època d'aparellament. Es creu que això podria ser la causa que la qualitat dels espermatozoides de búfal en la temporada de no aparellament és inferior a la d'aparellament.

Finalment, pel que fa a l'AQP11, s'ha trobat que l'expressió d'aquesta proteïna està correlacionada amb els gens que regulen l'espermatogènesi, la motilitat de l'esperma i la seva inflamació. A causa d'això, s'ha suggerit que l'AQP11 podria tenir un paper important en la regulació de la producció d'esperma.

³³ Modificats genèticament.

³⁴ Model knockout (KO): tècnica que consisteix en suprimir l'expressió d'un gen específic en un organisme, ja sigui un animal, una planta...

3.4.2 Funcions suggerides

Segons les dades obtingudes, les aquaporines estan presents en les cèl·lules de Sertoli i Leydig de la majoria d'espècies, fet que ens mostra la seva participació en la dinàmica d'absorció i secreció de fluids durant l'espermatogènesi. A més, el fet que la quantitat d'AQP0 variés segons l'etapa de l'epiteli seminífer ens indica que aquestes proteïnes també estan relacionades en els canvis morfològics i de volum que experimenten les cèl·lules germinals durant l'espermatogènesi.

D'altra banda, el fet que aquestes proteïnes estiguin present en els conductes eferents i epidídim de la majoria de les espècies ens indica que aquestes participen en el manteniment d'un entorn adequat per a la maduració i emmagatzematge d'espermatozoides.

A més a més, els conductes eferents reabsorbeixen aproximadament el 90% del fluid testicular per concentrar espermatozoides i, per tant, es necessita de canals d'aigua per a realitzar aquesta reabsorció. Això ens mostra que les aquaporines també tenen un paper important en l'absorció i secreció de líquid luminal.

Per últim, les aquaporines també han estat identificades en les glàndules annexes de l'aparell reproductor masculí, i un mal funcionament d'aquestes podria afectar les seves secrecions i, com a conseqüència, la composició del plasma seminal.

Resumint, les aquaporines juguen papers important al llarg de l'aparell reproductor masculí, papers relacionats amb la formació, concentració i emmagatzematge d'espermatozoides, així com en el manteniment d'un plasma seminal adequat.

Tot i així, les diferències en la localització de les aquaporines entre espècies i el fet que unes es puguin compensar amb altres, ens mostra que encara fa falta més investigació per esclarir el paper d'aquestes proteïnes.

4. LES AQUAPORINES EN L'ESPERMA DELS MAMÍFERS

4.1 Esperma dels mamífers

L'esperma o semen és el conjunt dels gàmetes masculins, els espermatozoides, i de les secrecions alliberades per els glàndules annexes de l'aparell reproductor masculí.

Per cada mil·lilitre de semen hi ha entre 20 i 100 milions d'espermatozoides.

Els espermatozoides ocupen aproximadament el 10% del volum del semen, la resta són els fluids alliberats per les glàndules annexes que n'asseguren la seva supervivència i desplaçament.

4.2 Estructura dels espermatozoides

Els espermatozoides són els gàmetes masculins i, per tant, la seva funció és transportar el material genètic del mascle a l'òcit per tal de que es produeixi la fecundació.

Aquests són més petits que la majoria de les cèl·lules del cos; de fet, el volum d'una cèl·lula d'esperma és 85.000 vegades menor que el del gàmet femení.

Els espermatozoides consten de tres parts: un cap, una peça mitjana o intermèdia i una cua.

El cap de l'esperma consisteix en el nucli haploide, el qual es troba molt compactat i envoltat per un citoplasma prim (citoplasma periacrosomal), i una estructura anomenada acrosoma que cobreix la punta anterior del nucli i conté els enzims hidrofílics necessaris per a dissoldre l'embolcall de l'òvul i penetrar-hi durant la fecundació.

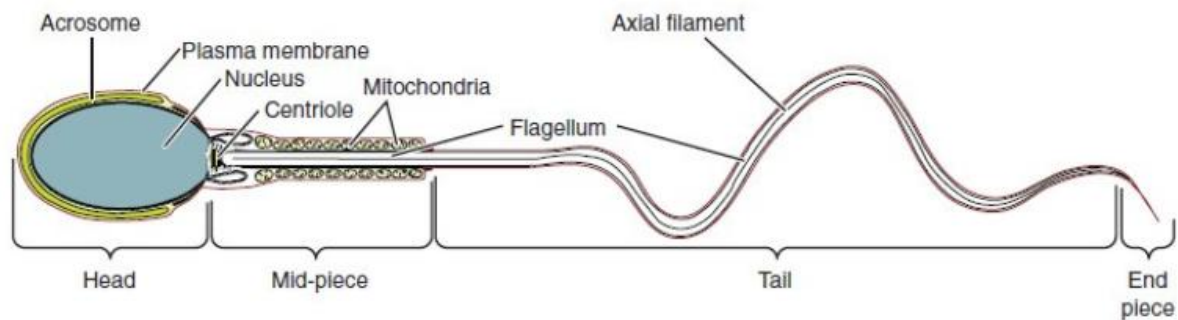
El nucli es compon gairebé enterament d'ADN, de manera que la seva funció és transmetre els caràcters hereditaris del mascle. Aquest ocupa la major part del cap i, per tant, la seva forma determina la forma del cap de l'esperma.

La peça mitjana està unida al nucli mitjançant el coll i està envoltada d'una vaina mitocondrial que té un paper important a l'hora de generar l'energia necessària per permetre la mobilitat de l'esperma.

La cua o flagel és l'aparell mòbil de l'esperma, ja que gràcies a l'energia proporcionada pels mitocondris permet la mobilitat de tota la cèl·lula espermàtica. Aquest s'estén des del coll i la mitja peça i es forma a partir d'un

centríol a l'interior de la cèl·lula espermàtica madurant durant les últimes etapes de l'espermatoït.

El muntatge adequat de tots els elements citoesquelètics és crític per a la motilitat de l'esperma.



Imatge 20³⁵: Espermatozoide i les seves parts

4.3 Localització de les aquaporines

Pel que fa a l'esperma, malgrat l'interès per aquestes proteïnes recentment descobertes, el nombre d'estudis realitzats per a identificar, localitzar i trobar la funció de les aquaporines en els espermatozoides han estat pocs.

Mentre que AQP3, AQP7, AQP9 i AQP11 són les més investigades, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, AQP10 i AQP12 encara no han estat identificades en l'esperma dels mamífers.

A continuació hi ha un recull de les localitzacions detectades fins el moment.

AQP	Localization	Species	Reference
AQP1	Not present in sperm, only reported in dogs	N/A	Curry et al. (1995); Ito et al. (2008); Liu et al. (1995)
AQP3	Sperm mid-piece	Human Mouse Pig Cattle	Chen et al. (2011); Laforenza et al. (2016); Prieto-Martínez et al. (2015); Prieto-Martínez, Morató et al. (2016)

³⁵ ER SERVICES, Anatomy and Physiology II. *Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System* [en línia] <<https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/anatomy-and-physiology-of-the-male-reproductive-system/>> [Consulta: 17 d'Octubre de 2018]

AQP7	Elongated spermatids, testicular and epididymal sperm tail	Mouse	Yeung et al. (2009)
	Elongated spermatids, testicular and epididymal sperm tail	Rat	Calamita, Mazzone, Bizzoca et al. (2001); Ishibashi et al. (1997); Suzuki-Toyota et al. (1999)
	Spermatids, sperm head and tail	Human	Laforenza et al. (2016); Moretti et al. (2012); Saito et al. (2004); Yeung et al. (2010)
	Tail and cytoplasmic droplet of epididymal spermatozoa. Connecting, mid- and principal pieces of ejaculated spermatozoa	Pig	Prieto-Martínez, Vilagran et al. (2016); Vicente-Carrillo et al. (2016)
	Mid-piece	Cattle	Kasimanickam et al. (2017); Prieto-Martínez et al. (2015)
AQP8	Epididymal sperm tail	Mouse	Yeung et al. (2009)
	Primary spermatocytes and elongated spermatids	Rat	Calamita, Mazzone, Bizzoca et al. (2001)
	Mid-piece of ejaculated sperm	Human	Laforenza et al. (2016); Yeung et al. (2010)
AQP9	Caudal epididymal sperm and head of ejaculated sperm	Pig	Vicente-Carrillo et al. (2016)
	Not present	Human	Yeung et al. (2010)
AQP11	Elongated spermatids and ejaculated sperm tail	Rat Mouse	Yeung and Cooper (2010)
	Ejaculated sperm tail	Human Pig	Laforenza et al. (2016); Prieto-Martínez, Morató et al. (2016)

Imatge 21³⁶: Localització de les AQP en l'esperma de mamífers

4.4 Funcions de les aquaporines

Els espermatozoides tenen una alta permeabilitat a l'aigua en comparació amb els altres tipus de cèl·lules de mamífers i, com ja hem dit anteriorment, el transport fluid i la regulació efectiva del volum cel·lular durant la formació, maduració i capacitació dels espermatozoides són molt importants.

Degut a aquest fet, es creu que les AQP podrien tenir un paper important en la regulació del volum cel·lular des de la formació dels espermatozoides fins la fecundació de l'òvul, i en l'adaptació de l'esperma després de l'ejaculació.

Arran d'això, amb la informació obtinguda en l'estudi de les seves localitzacions, diverses funcions han estat suggerides i estudiades.

³⁶ YESTE, M; MORATÓ, R; RODRÍGUEZ-GIL, JE; BONET, S; PRIETO-MARTÍNEZ, N. «Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology». *Reproduction in domestic animals*, vol. 52, núm. 4, octubre de 2017, p. 12-27

4.4.1 Dades a destacar

En ratolins i humans es va trobar AQP3 en la peça principal de la cua de l'espermatozoide i, com que en aquesta zona es produeixen processos reguladors de volum, es va voler estudiar el paper de l'AQP3 en aquests processos.

L'any 2011 en un estudi per tal de determinar el paper de l'AQP3 en la regulació de volum de l'esperma, es va establir un model KO per a l'AQP3. Els resultats que es van obtenir mostraven que, tot i que l'activació de la motilitat de l'esperma en resposta al canvi osmòtic no havia variat, els espermatozoides mostraven menys capacitat per regular el seu volum i, al entrar a l'úter, les cèl·lules es van deformar, fet que va afectar la seva capacitat de fertilització. Aquestes dades suggerien que l'AQP3 realitza un paper crucial en la regulació del volum dels espermatozoides.

Pel que fa a l'AQP7, diversos estudis suggereixen una relació entre aquesta aquaporina i la qualitat i capacitat de fertilització de l'esperma. N'és un exemple l'estudi realitzat per Saito i altres l'any 2004, en el qual va comparar els espermatozoides d'homes fèrtils i els d'homes infèrtils. En aquest, va trobar que tots els espermatozoides dels homes fèrtils presentaven AQP7, en canvi, un 23% d'homes infèrtils no presentaven AQP7 en els seus espermatozoides.

Malgrat això, altres estudis contradiuen aquests resultats, un exemple és l'estudi de Sohara i altres realitzat al 2007. En aquest Sohara va establir un model KO per a l'AQP7 i va trobar que aquests models continuaven sent fèrtils i produïen espermatozoides normals. Cal destacar que, com ja hem dit anteriorment, aquestes proteïnes es podrien compensar entre si, de manera que la funció exercida per l'AQP7 podria estar compensada per altres AQPs.

A més a més, també s'ha trobat que l'AQP7 podria estar correlacionada amb diversos paràmetres d'esperma com la motilitat de l'esperma. Com a exemple, el 2004 es va trobar que el contingut d'AQP7 en espermatozoides d'humans estava correlacionat amb la motilitat dels espermatozoides, o el 2012 es va observar que el contingut relatiu d'AQP7 en espermatozoides morfològicament anormals era menor que en espermatozoides normals.

Tot i així, el model KO per a l'AQP7 anteriorment esmentat diferia dels resultats obtinguts en aquests estudis, ja que en aquest model la motilitat i capacitat de fertilització dels espermatozoides no es diferenciaven dels normals. Per tant, caldria realitzar més estudis per tal d'esclarir el paper de l'AQP7.

Referent a l'AQP8, s'ha trobat que el contingut d'AQP8 es relaciona inversament amb el grau d'enrotllament de la cua de l'esperma i, a partir d'aquestes dades, s'ha suggerit que aquesta proteïna participa en l'adaptació dels espermatozoides davant les variacions d'osmolaritat que pateix a l'entrar a l'aparell reproductor femení.

Finalment, a partir dels estudis realitzats en l'AQP11, s'ha suggerit que aquesta aquaporina podria dur a terme un paper important en la reducció del citoplasma de les espermatides durant l'espermatogènesi.

4.4.2 Funcions suggerides

Segons les dades obtingudes, l'AQP3, l'AQP7, l'AQP8 i l'AQP11 són les més abundants en els espermatozoides i tenen un paper important en la regulació del volum cel·lular durant l'espermatogènesi.

A més, els estudis esmentats en l'apartat anterior ens mostren que les aquaporines estan involucrades en la regulació del volum dels espermatozoides al llarg del seu recorregut per l'aparell reproductor masculí i pel femení, durant el qual pateixen diversos canvis d'osmolaritat.

Tot i així, com que els estudis realitzats per estudiar el paper de les aquaporines en l'esperma són escassos i com que els resultats obtinguts en els models KO no són fiables, encara fa falta més investigació per acabar d'esclarir els seus papers.

5. AQUAPORINES I CRIOBIOLOGIA DE SEMEN

5.1 Criopreservació

La criopreservació és la preservació de la funcionalitat de les cèl·lules o teixits durant llargs períodes de temps mitjançant la reducció de la temperatura per sota del punt on les reaccions químiques poden tenir lloc. Per tant, les dificultats de la congelació no provenen de la permanència a baixes temperatures, sinó que aquestes apareixen durant els processos de congelació i descongelació.

El desenvolupament de la criopreservació de semen ha fet possible la creació de bancs de semen, per tal d'emmagatzemar material genètic i usar-lo més tard en tècniques de reproducció assistida.

No obstant, en algunes espècies l'ús de semen congelat en les tècniques de reproducció assistida no acaba de ser del tot efectiu ja que el semen no tolera bé els processos de congelació i descongelació.

5.2 Tipus de Criopreservació

Actualment existeixen dos mètodes de criopreservació utilitzats en els bancs de semen o centres de reproducció assistida: la congelació lenta o convencional, i la vitrificació.

5.2.1 Congelació lenta

Aquest mètode bàsicament consisteix en anar refredant lentament la mostra, controlant les velocitats de refredament, seguint un descens de temperatura programat.

Mitjançant aquest mètode s'aconsegueix una formació controlada de gel extracel·lular, però evitant la formació de gel intracel·lular, el qual resulta letal per a la cèl·lula.

5.2.2 Vitrificació

En aquest mètode s'utilitza un refredament sobtat de la mostra evitant d'aquesta manera la formació tant de gel intracel·lular com de gel extracel·lular.

Tot i que no es produeixi gel, aquesta tècnica també presenta problemes en la supervivència de la cèl·lula ja que existeixen altres factors que la perjudiquen greument.

5.3 Problemes en la criopreservació

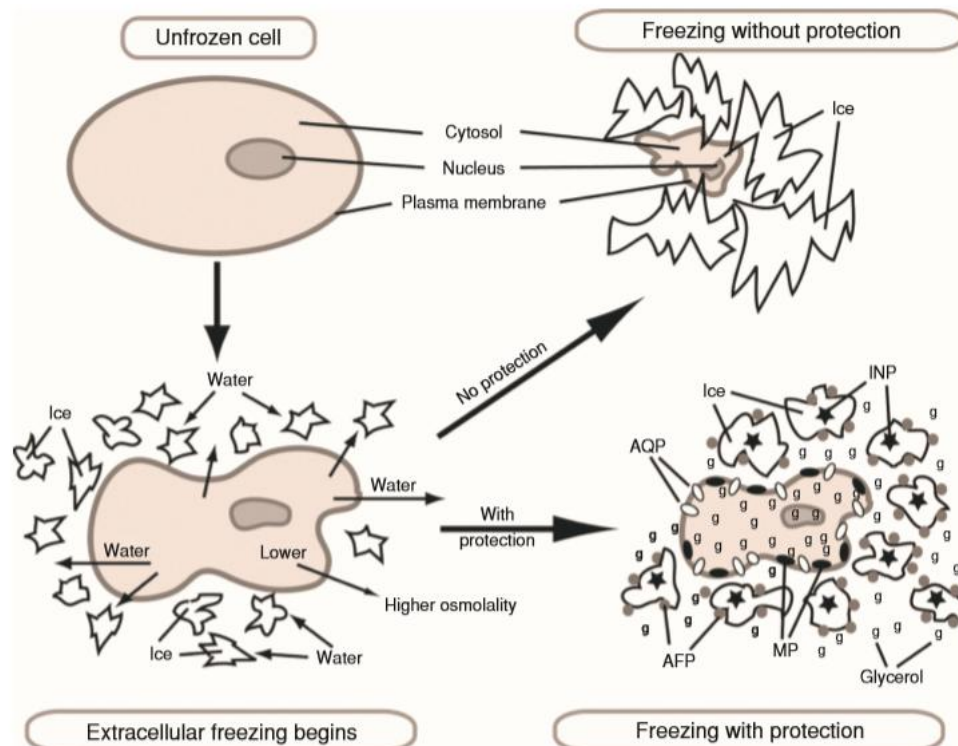
Com que la cèl·lula està formada majoritàriament d'aigua, al baixar la temperatura durant el procés de congelació, es comença a formar gel en el medi intracel·lular i extracel·lular, afectant així la integritat de la cèl·lula. Per aquest motiu, tant en la congelació lenta com en la vitrificació s'utilitzen crioprotectors, substàncies que protegeixen la cèl·lula del dany que es produeix durant la congelació, principalment a causa de la formació de gel. Un dels crioprotectors usats amb més freqüència és el glicerol.

Tot i l'ús d'aquestes substàncies, els danys causats a la cèl·lula durant els processos de congelació i descongelació segueixen sent importants, ja sigui per xocs de fred, per la toxicitat dels crioprotectors o pels forts canvis osmòtics que pateix la cèl·lula durant aquests processos.

5.4 Funció de les aquaporines

Quan s'inicia la criopreservació de la cèl·lula, la disminució de les temperatures causa la formació ràpida de gel en el medi extracel·lular. Com que el gel exclou els soluts, l'osmolaritat del medi extracel·lular augmenta ràpidament causant un estrès osmòtic a la cèl·lula la qual, per contrarestar-lo, es comença a deshidratar ràpidament. Això provoca una disminució del seu volum i, si el volum de la cèl·lula sobrepassa un mínim crític, es poden provocar danys en la integritat de la membrana plasmàtica.

Per contrarestar aquests danys s'utilitzen els crioprotectors, aquests creen resistència osmòtica a la pèrdua d'aigua i contribueixen a evitar que el volum cel·lular caigui per sota d'un mínim crític.



Imatge 22³⁷: Comparació entre la congelació d'una cèl·lula amb crioprotectors i AQP, i una sense

Tot això causa que durant la congelació i descongelació la cèl·lula experimenti moviments massius d'aigua i crioprotectors entre els espais extracel·lulars i intracel·lulars. I, tot i que l'aigua pot fluir per difusió passiva a través de les membranes, en situacions en què es necessita un flux elevat d'aigua es fa servir les anomenades aquaporines.

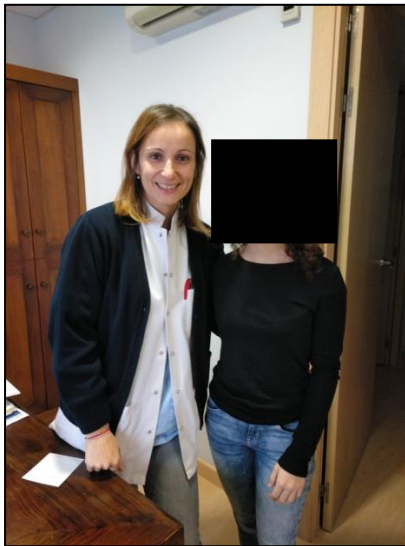
A més, el fet que el glicerol sigui un dels crioprotectors més utilitzats i que un tipus d'aquaporines, les aquagliceroporines, no sol permetin el pas d'aigua sinó també el del glicerol, ha dut a pensar que la presència d'aquaporines en el semen podria està correlacionada amb la criotolerància d'aquest.

³⁷ STOREY, Kenneth B; STOREY, Janet M. «Molecular Biology of Freezing Tolerance». *Comprehensive Physiology*, vol. 3, núm. 3, juliol de 2013, p. 1283-1308

6. VISITA A BANC DE SEMEN

Durant aquesta segona part de la pràctica, el meu objectiu era visitar un banc de semen per tal de conèixer el seu funcionament i d'aprendre més sobre la criopreservació no sols de semen, sinó també d'altres teixits biològics com embrions i oòcits.

Per fer-ho, vaig anar a visitar el Instituto de Reproducción CEFER de Lleida on l'Ester Vilamajó i Rodié, embrióloga del Instituto de Reproducción CEFER, em va fer una breu explicació sobre el funcionament del banc de semen i va respondre als dubtes que tenia.



Imatge 23: Foto amb l'Ester Vilamajó i Rodié



Imatge 24: Instituto de Reproducción CEFER

6.1 Explicació

En el nostre banc de semen es realitza la criopreservació de semen, òvuls i embrions. Per criopreservar el semen utilitzem la tècnica de congelació lenta o tradicional, i per congelar els òvuls i embrions utilitzem la tècnica de vitrificació.

Recullim la mostra i segons si és semen o òvuls/embrions es col·loca en un recipient o un altre.

Els òvuls i embrions es criopreserven dins d'un recipient anomenat cryotop, en aquest es col·loquen tres cèl·lules com a màxim, amb una quantitat mínima de medi de congelació. En canvi, el semen es criopreserva dins unes palletes de plàstic anomenades CBS amb una relació 1:1 del medi cultiu amb els espermatozoides i el medi de congelació amb els crioprotectors, és a dir, el 50%

del CBS s'omple amb medi de cultiu i l'altre 50% s'omple amb medi de congelació.



Imatge 25: Recipient on es guarden les cistelles amb els CBS, les palletes amb semen



Imatge 26: CBS, recipient on es col·loca el semen per criopreservar

6.2 Preguntes

- **Quina és la diferència entre el mètode de vitrificació i el mètode de congelació convencional?**

La vitrificació és un procés molt més ràpid que la congelació lenta, de manera que la cèl·lula ràpidament perd tot el líquid perquè no és formen els cristalls de gel. En la vitrificació, en menys d'un minut es fa passar la cèl·lula per diversos medis amb diferents concentracions i directament es col·loca en el nitrogen líquid per tal de congelar-la.

En canvi, la congelació convencional és un procés molt més lent.

- **Perquè per criopreservar el semen s'utilitza la congelació lenta i per criopreservar els òvuls i embrions s'utilitza la vitrificació?**

En els òvuls i embrions el mètode de congelació lenta no era efectiu ja que són més delicats i elaborats que no pas els espermatozoides. I, com que solament tenim un òvul o embrió, és important que aquest sobrevisqui.

En canvi, en el semen com que la quantitat d'espermatozoides és molt gran, solament fa falta que en sobrevisquin uns quants, no fa falta que sobrevisquin tots. Tot i així, en els donants si que es busca que el seminograma sigui més alt que normalment, perquè hi ha una mortalitat d'un 20% que ja s'assumeix.

- **Quins crioprotectors s'utilitzen?**

El crioprotector que s'utilitza en la criopreservació del semen és el glicerol, en la vitrificació s'utilitzen altres crioprotectors.

- **Quin és el principal problema a l'hora de criopreservar el semen?**

El principal problema a l'hora de criopreservar és el xoc osmòtic i la formació de cristalls, ja que si al descongelar s'han format cristalls en l'interior de les cèl·lules, aquests poden provocar que la cèl·lula es trenqui i degeneri.

- **Quan de temps es pot tenir el semen i els òvuls congelats?**

Una vegada congelats, el semen, òvuls o embrions es poden mantenir el temps que es vulgui. El procés delicat és el de congelació i descongelació, un cop estan en nitrogen líquid, tal com s'han congelat es mantenen.

- **Al criopreservar el semen s'obreviuen totes les cèl·lules?**

En la criopreservació del semen sempre hi ha un 20% de mortalitat que ja s'assumeix. En canvi, en els embrions la taxa de supervivència està al voltant del 100%. Amb la vitrificació s'ha vist que la supervivència de les cèl·lules és major.

- **Com s'escolleixen els donants?**

A l'hora d'escollir els donants es mira tant les característiques físiques com el grup sanguini. A més, també es fan tests genètics per a les malalties recessives, en les quals tant el pare com la mare són portadors del gen recessiu que provoca la malaltia.

7. PRÀCTICA DE LABORATORI

Per fer la pràctica de laboratori vaig anar a la Facultat de Veterinària de la UAB on la Doctora Maria Montserrat Rivera del Alamo em va ajudar durant tot el procés.



Imatge 27: Foto amb la Doctora Maria Montserrat Rivera del Alamo

En aquesta pràctica el meu objectiu era intentar descobrir si el semen de gos presenta AQP2 i AQP9.

He volgut centrar-me en el semen ja que la presència d'aquaporines en el semen de mamífers ha estat menys investigada que en l'aparell reproductor masculí o en els oòcits.

Pel que fa a les aquaporines, he escollit l'AQP2 i l'AQP9 per diversos motius. Primerament, vaig escollir investigar aquestes dues aquaporines ja que, tot i la recerca ja realitzada sobre la presència d'altres AQPs en el semen de gos, segons el meu coneixement encara no s'ha intentat identificar ninguna d'aquestes dues aquaporines en el semen d'aquesta espècie.

D'altra banda, totes dues pertanyen a grups diferents, l'AQP2 pertany al grup de les aquaporines ortodoxes, i l'AQP9 pertany al grup de les aquagliceroporines. Això és important per si més tard es vol investigar la relació d'aquestes dues aquaporines amb la criotolerància dels espermatozoides, ja que una d'elles permet el pas d'aigua, i l'altra permet el pas d'aigua i de glicerol.

Per últim, vaig escollir l'AQP2 perquè aquesta proteïna encara no ha estat identificada en l'esperma de mamífers.

Per fer-ho, hem utilitzat varies mostres amb les proteïnes dels espermatozoides de diversos ejaculats, obtinguts de gossos de diverses races, i hem fet servir la tècnica del Western Blot, una tècnica de laboratori utilitzada per a detectar una proteïna específica en una mostra.

Aquesta consta de quatre fases: una electroforesi, una transferència, un bloqueig i detecció, i revelar.

7.1 Hipòtesi

En el principi de la meva pràctica era difícil saber quin serien els resultats que obtindria ja que la presència i localització de les aquaporines en el semen dels mamífers varia entre espècies.

Tot i així, tenint en compte els estudis ja realitzats, com que l'AQP2 encara no havia estat identificada en el semen de les diverses espècies de mamífers estudiades, la meva hipòtesi inicial era que aquesta aquaporina no estaria present en el semen de gos.

I com que l'AQP9, al ser una de les més investigades i haver estat identificada en semen de porc, la meva hipòtesi era que l'AQP9, al contrari que l'AQP2, si seria present en el semen de gos.

7.2 Materials i reactius utilitzats

Abans de parlar dels materials necessaris per a realitzar aquesta pràctica, hem de parlar de dos materials bàsics a l'hora de treballar en un laboratori:

- Bata de laboratori → en tota pràctica de laboratori és obligatori utilitzar bata de laboratori com a mesura de protecció, per evitar el contacte de la nostra pell amb certs reactius que podrien danyar-la.
- Guants → també és obligatori utilitzar guants, no sols com una mesura de protecció, sinó que també s'han d'utilitzar per evitar que proteïnes, microorganismes... de la nostra pell puguin interferir en els nostres resultats.

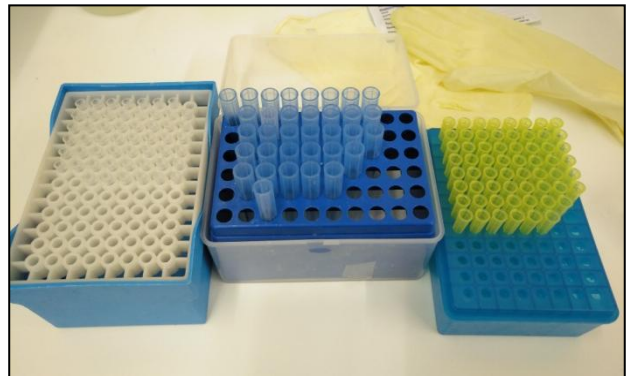
Els materials utilitzats en aquesta pràctica de laboratori són els següents:

- Pipetes de diversos volums i les respectives puntes
- Estisores, llapis i 4 capsetes verdes
- Aparell d'electroforesi
- Tubs de tap blau i gradeta corresponent
- Vidres i suports en l'electroforesi

- Espàtula de plàstic
- Agitador
- Balança analítica
- Matràs aforat de 100ml
- Vòrtex
- Paper de filtre
- Cinta adhesiva i retolador
- Aparell de transferència
- Membranes de nitrocel·lulosa
- Casset radiogràfic
- Làmines de polièster
- Pel·lícules radiogràfiques i llum vermella
- Pinces de plàstic i safates de plàstic



Imatge 28: Pipetes de diversos volums

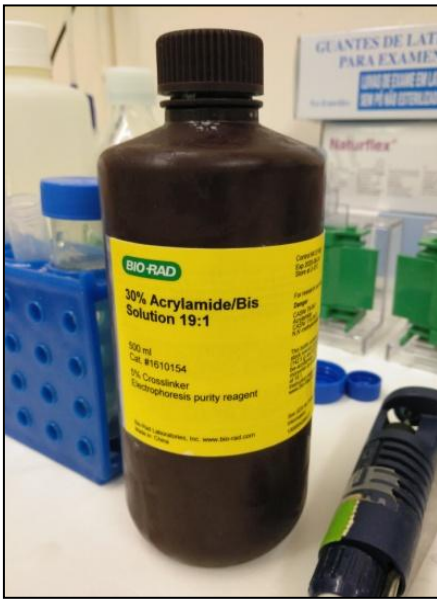


Imatge 29: Puntetes de les pipetes

Els reactius necessaris per a realitzar aquesta pràctica han estat:

- Tampó d' electroforesi 10X
- Acrilamida mix al 30%
- APS al 10%
- Tris 1'5M (pH 8'8)
- Tris 1'0M (pH 6'8)
- SDS al 10%
- TEMED
- TBS 1X

- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Anticòsos primaris per a les aquaporines 2 i 9
- Anticòs secundari
- Tween20
- TBST (TBS+Tween20)
- Reactiu per revelar
- Revelador
- Fixador



Imatge 30: Acrilàmida al



Imatge 31: APS al 10%



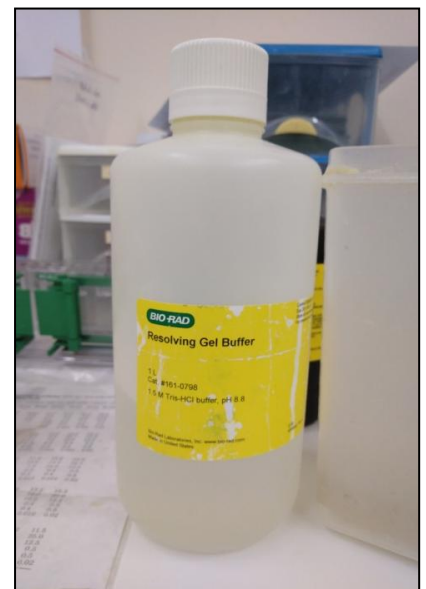
Imatge 32: SDS al 10%



Imatge 33: TEMED



Imatge 34: Tris 1'0M (pH



Imatge 35: Tris 1'5M (pH 8'8)

7.3 Westerns Blots

7.3.1 Electroforesi

La primera fase del western blot és una electroforesi, aquesta ens permet separar les proteïnes segons el seu pes molecular. Les que pesen més queden més a munt, i les que pesen menys queden més avall.

Al treballar amb proteïnes s'ha de ser molt curós perquè pots tenir moltes interferències, s'ha de tenir sempre el material molt net, utilitzar guants...

Teòricament el material sempre es guarda net, però per assegurar-nos el millor és tornar-ho a rentar una altra vegada abans d'utilitzar-lo.

Lavors, primer de tot el que vam fer va ser netejar tot el material que faríem servir amb aigua destil·lada i eixugar-lo amb paper.



Imatge 36: Material assecant-se

La preparació del gel és una de les parts més importants de l'electroforesi, ja que el gel és com una gelatina per on després es fan córrer les nostres mostres per poder separar les proteïnes.

El gel es fa a partir d'uns reactius que són líquids i han de polimeritzar, és a dir, passar d'una fase líquida a una fase sòlida. De manera que el següent pas era crear un cavitat, un receptacle que ens permetés posar aquesta dilució perquè polimeritzés.

Això ho vam fer mitjançant una sèrie de vidres i cassets o suports de pines que creaven una cavitat. Per muntar tota l'estructura vam agafar dos vidres, un més alt que l'altre, els vam col·locar dins el suport de pines o casset i els vam encaixar cap a baix per assegurar que quedaven a la mateixa alçada tan els vidres com els suports. En acabar, vam tancar el casset, tirant les pines enfora

perquè els vidres quedessin ben subjectats, i vam repetir aquest procés unes altres tres vegades per tenir quatre cavitats, ja que volíem fer quatre gels.

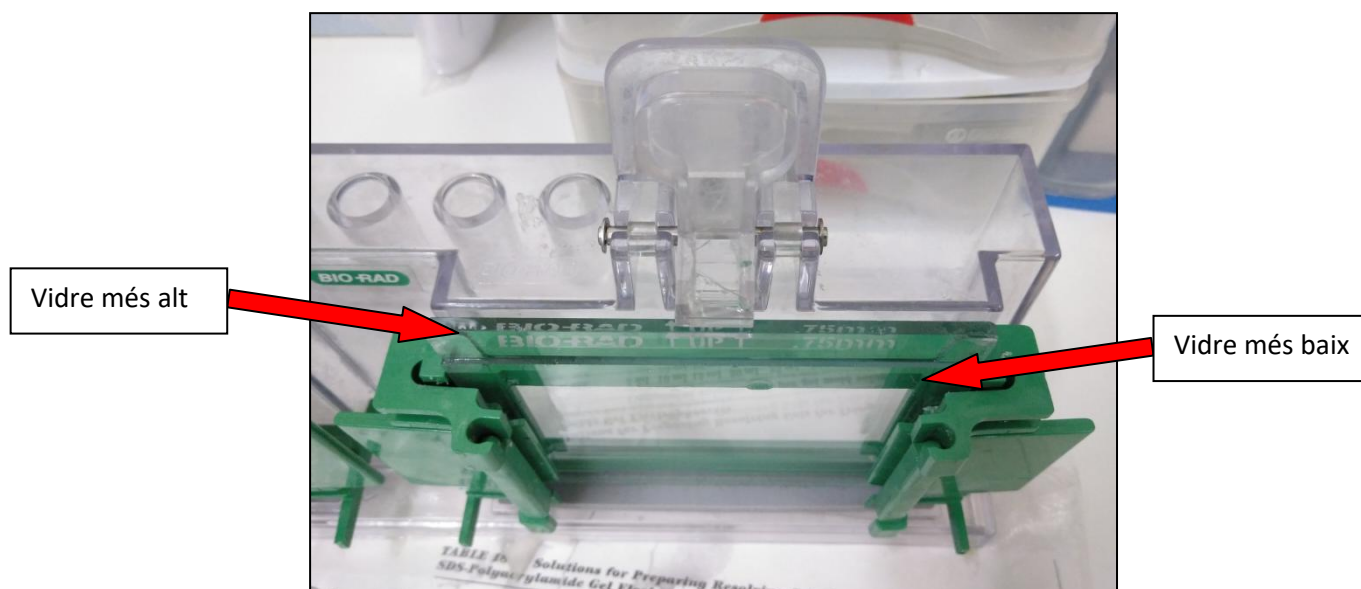


Imatge 37: Col·locació dels vidres en el suport de pinces

Però, encara no hi podíem posar cap tipus de líquid ja que la part de baix no estava tancada, llavors el que vam fer és posar els cassets amb els vidres en uns suports que tenien un goma que impedeix la sortida del líquid, quedant així una cavitat estanca.



Imatge 38: Estructura de suports



Imatge 39: Cavitat dels vidres

Però, abans de posar cap dilució ens havíem d'assegurar que la cavitat que havíem creat era estanca, ja que sinó en el moment en que hi poséssim els reactius, si la cavitat no era estanca, s'escularien i marxarien. Llavors, per comprovar que realment la cavitat entre els vidres era totalment tancada, hi vam posar aigua per veure si perdia.

Hi ha dos tipus d'aigua purificada, l'aigua destil·lada i la MiliQ, que és encara més purificada que l'aigua destil·lada.

Llavors, en aquest cas vam utilitzar aigua MiliQ ja no volíem que res ens interferís, i teòricament l'aigua MiliQ és aigua completament pura que no té res que no sigui la molècula en si.

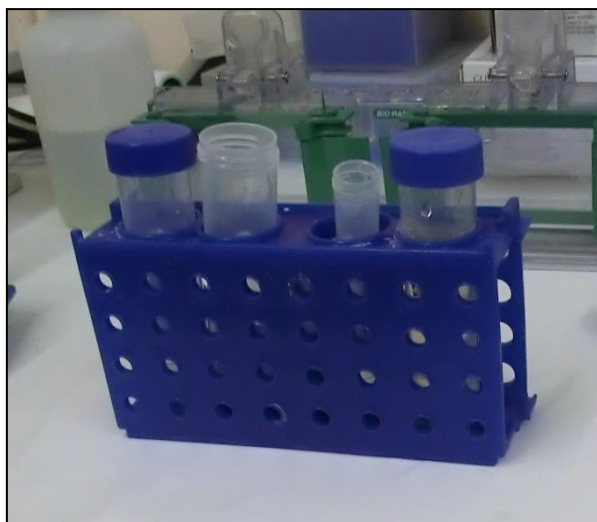
Per tant, simplement vam omplir les quatre cavitats mitjançant una pipeta i ho vam deixar reposant una estona.

Mentrestant, vam començar el següent pas: fer la dilució per tenir el gel.

El gel consta de dues parts: el gel com a tal, i la part superior que s'anomena stacking, el qual el que fa és alinear les proteïnes perquè després quan arribin al gel corrin en forma de front i no es creuin entre elles.

Hi ha diferents tipus de gels en funció de si volem que siguin més o menys densos, en aquest cas volíem treballar amb gels al 10% d'acrilamida. I, en funció de si fem més o menys gels necessitem més o menys volum; en aquest cas com que preparàvem 4 gels necessitàvem 20ml de gel i 6ml d' stacking.

Per fer el gel i l' stacking bàsicament vam utilitzar tubs de tap blau per posar els diversos reactius, i pipetes de diversos volums segons la quantitat de reactiu que havíem de posar. Els reactius que necessitàvem per fer la dilució del gel coincidien la majoria amb els que necessitàvem per l' stacking llavors, quan els reactius eren els mateixos en l'un i en l'altre, ho anàvem fent en paral·lel.



Imatge 40: Tubs de tap blau amb gradeta

El primer que havíem de col·locar era aigua MiliQ, el volum d'aigua que necessitàvem en el gel era 7'9ml i en l' stacking, 4'1ml d'aigua.

El següent reactiu era acrilamida mix al 30%, l'agent que es polimeritza. La manera correcta per treballar és posar una quantitat, més o menys la que puguis necessitar, en un tub i treballar a partir d'aquest, per no contaminar tot el pot. En el gel necessitàvem 6'7ml d'acrilamida mix al 30% i en l' stacking 1ml.

El següent reactiu era el Tris, el qual era diferent pel gel que per l' stacking. En el gel necessitàvem 5ml de Tris 1'5M, i en l' stacking necessitàvem 0'75ml de Tris 1'0M.

El següent era SDS al 10%, un detergent que el que fa és desnaturalitzar les proteïnes perquè puguin córrer bé. Necessitàvem 0'2ml en el gel i 0'06ml en l' stacking.

Després, el persulfat d'amoni al 10% (APS), 0'2ml en el gel i 0'06ml en l' stacking.

TABLE 18.3 Solutions for Preparing Resolving Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Solution components	Component volumes (ml) per gel mold volume of							
	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%								
H ₂ O								
30% acrylamide mix	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
10% SDS	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%								
H ₂ O								
30% acrylamide mix	2.3	4.6	6.9	9.2	11.5	13.9	18.5	23.2
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
10% SDS	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%								
H ₂ O								
30% acrylamide mix	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
10% SDS	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%								
H ₂ O								
30% acrylamide mix	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
10% SDS	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%								
H ₂ O								
30% acrylamide mix	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
10% SDS	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% ammonium persulfate	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

Imatge 41³⁸: Taula amb els diversos reactius i les respectives quantitats segons el volum del i la seva concentració d'acrilamida

TABLE 18.4 Solutions for Preparing 5% Stacking Gels for Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Solution components	Component volumes (ml) per gel mold volume of							
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
H ₂ O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% acrylamide mix	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% ammonium persulfate	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Tables 18.3 and 18.4 are modified from Harlow and Lane (1988).

Imatge 42³⁹: Taula amb els diversos reactius de l' stacking i les respectives quantitats

³⁸ Documentació facilitada per la doctora Maria Montserrat Rivera del Alamo (UAB)

³⁹ Ibídem

Així que, abans de posar el TEMED i havent ja comprovat que les cavitats no perdien, vam buidar l'aigua de les cavitats. Per fer-ho, simplement vam abocar l'aigua per la part de dalt i vam assecar el que quedava amb paper absorbent o paper de filtre.



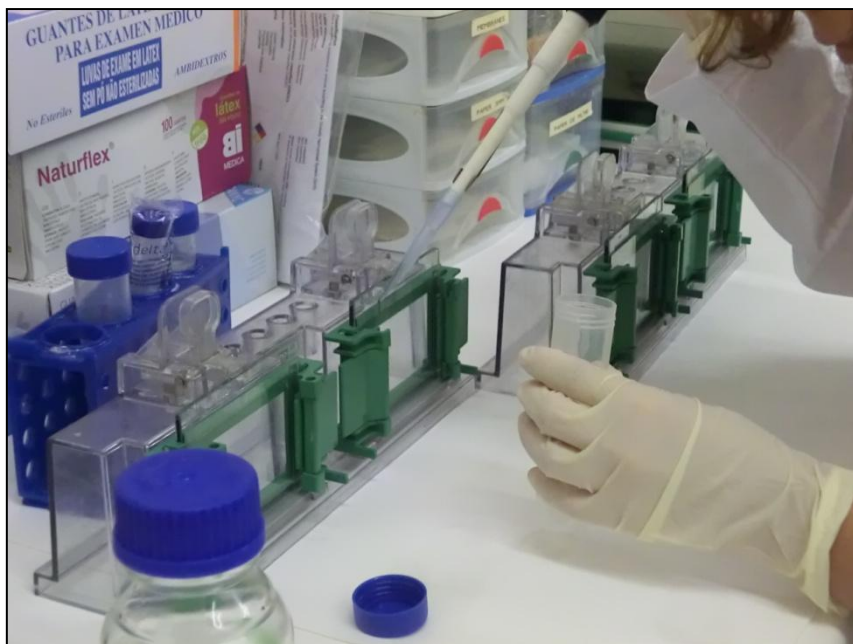
Imatge 43: Cavitats assecant-se amb paper absorbent

A l'acabar, vam posar el TEMED (0'008ml), però en aquest cas sol en el gel perquè si haguéssim posat el TEMED tant en el gel com en l' stacking, l' stacking hagués polimeritzat abans de carregar.

Ja preparada la dilució del gel, la vam barrejar de manera suau inclinant-la d'un costat a l'altre perquè no es formés espuma, i la vam carregar en les quatre cavitats, just fins al marge verd. A més, vam acabar d'omplir fins dalt amb aigua MiliQ per fer recte el marge superior i eliminar totes les bombolles que s'haguessin pogut formar al carregar el gel, com que tenen densitats diferents no es barrejaran i les bombolles pujaran cap a dalt.



Imatge 44: Pipetejant la dilució



Imatge 45: Omplint les cavitats de dilució

A continuació havíem d'esperar fins que polimeritzés i, per saber si havia polimeritzat o no, el que vam fer va ser observar el que havia sobrat de la dilució en el tub com a control, així quan el gel del tub hagués polimeritzat, significaria que el de les cavitats també hauria polimeritzat. Però, com que a vegades el gel a les cavitats polimeritza però al tub no, també vam utilitzar una altra manera d'observar si havia polimeritzat o no.

Al carregar, nosaltres havíem omplert de gel fins a la ratlla verda però, tot i que les cavitats són estanques, certa pèrdua si que n'hi ha. Així que el front, el límit superior del gel, ens havia de baixar. Llavors, quan el gel estigués polimeritzat, per sota del marge verd apareixeria una ratlleta visible a causa de la diferència de densitats.

Quan el gel i l' stacking haguessin polimeritzat, aproximadament uns vint minuts després, el següent pas seria agafar aquestes cavitats i col·locar-les totes quatre dins d'un altre suport més gran, de manera que els vidres més petits quedarien mirant cap endins. I ja podríem fer la reacció d'electroforesi que el que faria seria separar-nos les proteïnes segons el seu pes molecular.

Però la reacció d'electroforesi és una reacció que no es pot fer en sec, necessita un fluid al voltant, i és el que se'n diu tampó d'electroforesi. El tampó d'electroforesi és un reactiu que es compra preparat fins a cert punt, es compra un tampó que està en una concentració de 10X (cubet solutions Biorad Tris/Glicine/SDS), però es treballa a 1X i, per tant, s'ha de diluir.

Llavors, mentrestant el gel polimeritzava, vam anar preparant el tampó d'electroforesi. Com que nosaltres volíem preparar 1L de tampó 1X, vam agafar 0'1L de tampó 10X i els vam diluir amb 0'9L d'aigua destil·lada.



Imatge 46: Tampó d'electroforesi 10X



Imatge 47: Agafant l'aigua destil·lada

Quan ja teníem el gel polimeritzat, vam buidar l'aigua per decantació i eixugar les gotetes que quedaven amb paper de filtre.



Ratlleta del gel
polimeritzat

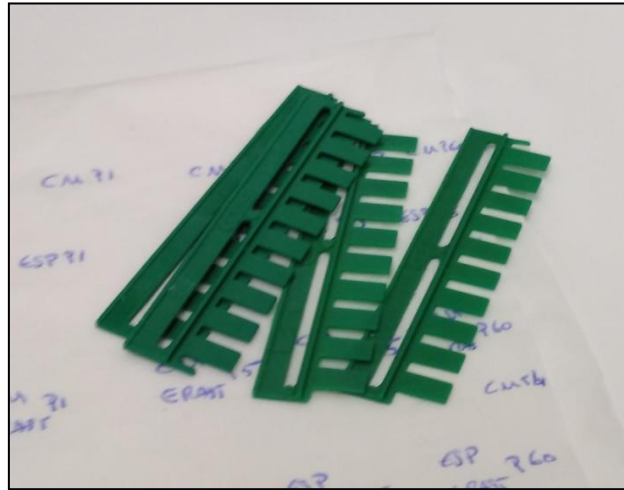
Imatge 48: Gel polimeritzat



Imatge 49: Eixugant l'aigua

I ara si, vam afegir el TEMED a l' stacking. Per fer-ho, vam agafar la quantitat necessària de TEMED (6 μ l) i el vam afegir en la dilució, de la mateixa manera que en el gel, vam barrejar una miqueta de manera suau i el vam col·locar en les cavitats gairebé fins dalt de tot.

En aquest cas no se'ns queda dibuixada cap línia així que vam deixar una mica de dilució com a control per saber quan estava polimeritzat. Ara bé, havíem de dibuixar les línies per on anirien les proteïnes, de manera que el que vam fer va ser posar unes pintes perquè l' stacking solidifiqués al seu voltant creant una mena de pous on posaríem les mostres. Com que en l' stacking la dilució polimeritza molt ràpid, vam haver de carregar i posar les pintes de manera ràpida.



Imatge 50: Pintes



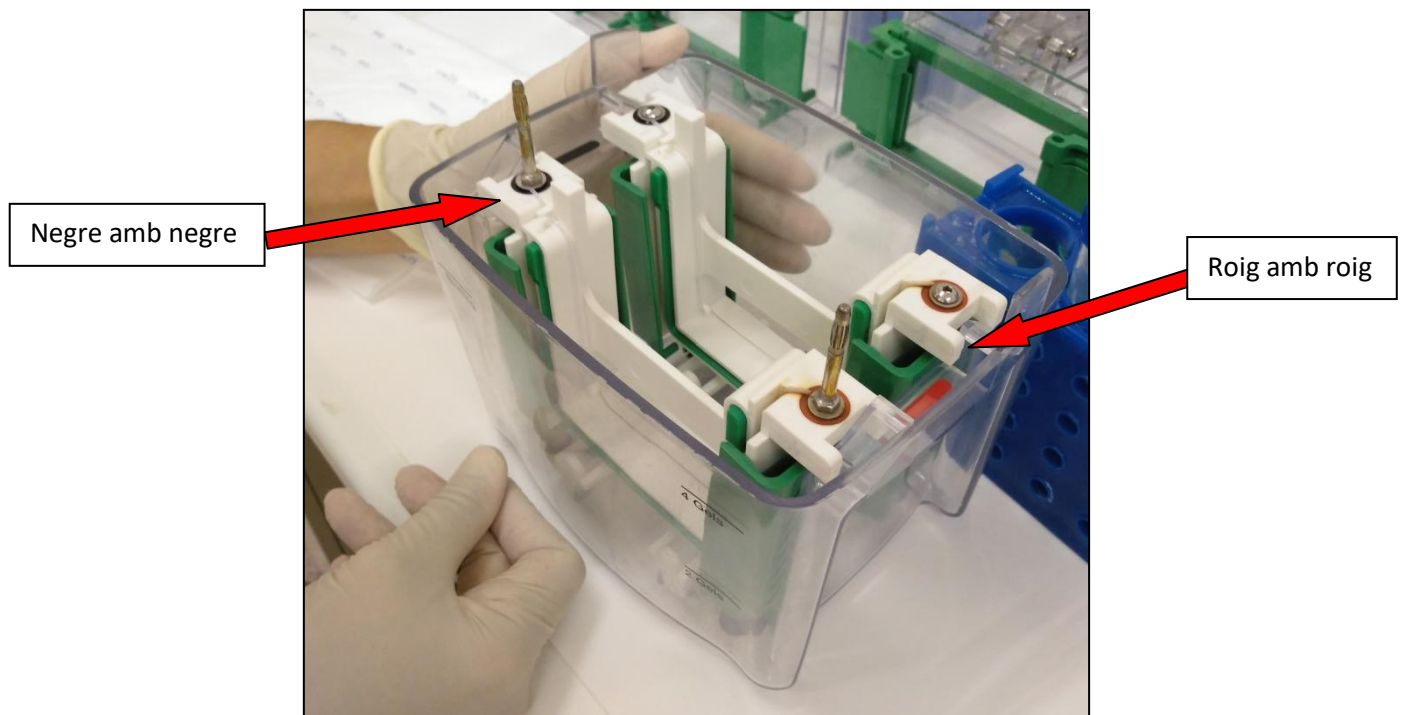
Imatge 51: Stacking polimeritzant

Quan l' stacking ja havia polimeritzat, vam treure les cavitats dels suports i fent pressió amb els dits vam treure les pintes de l' stacking.



Imatge 52: Traient les pintes

Després, havíem de posar els gels en un suport d'elèctrodes. Com que han d'estar coberts de tampó, col·loquem les cavitats amb els vidres curts cap endins creant una cavitat interna i, simplement, col·loquem aquests suports en un suport més gran, posant el negre amb negre i el vermell amb vermell. Això és molt important perquè sinó l'electricitat no circula i no és podrà fer l'electroforesi.

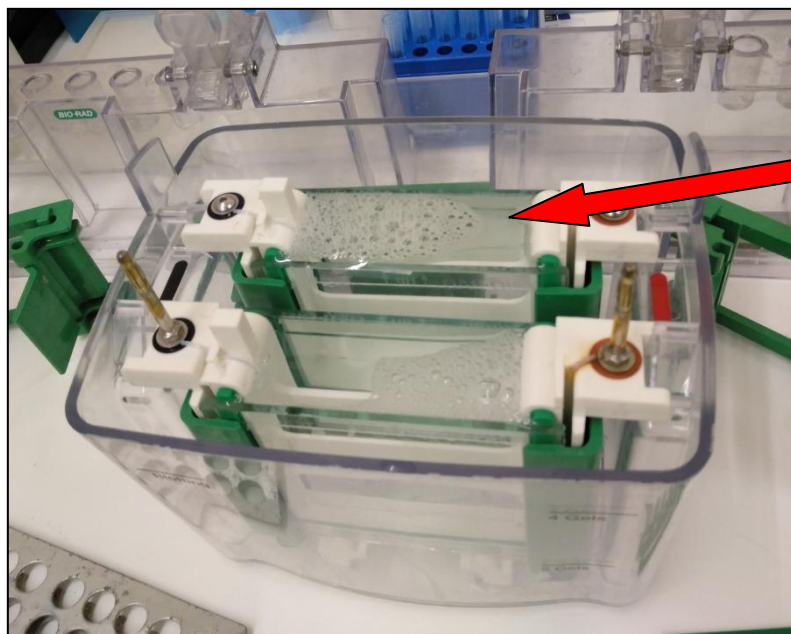


Imatge 53: Estructura de suports



Imatge 54: Col·locant els vidres

A l'acabar, vam omplir la cavitat interna fins l'altura dels vidres amb el tampó d'electroforesi preparat anteriorment, i vam repetir el procés amb la cavitat externa, però en aquest cas solament fins la meitat aproximadament.

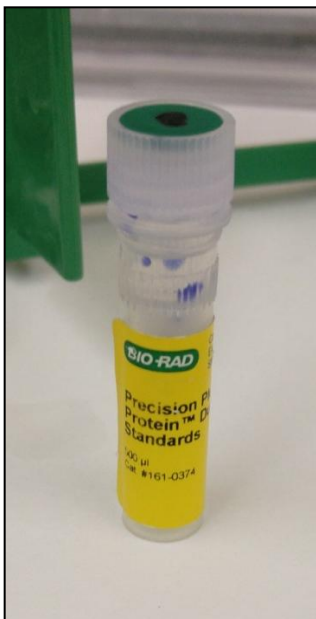


Imatge 55: Cavitats amb tampó

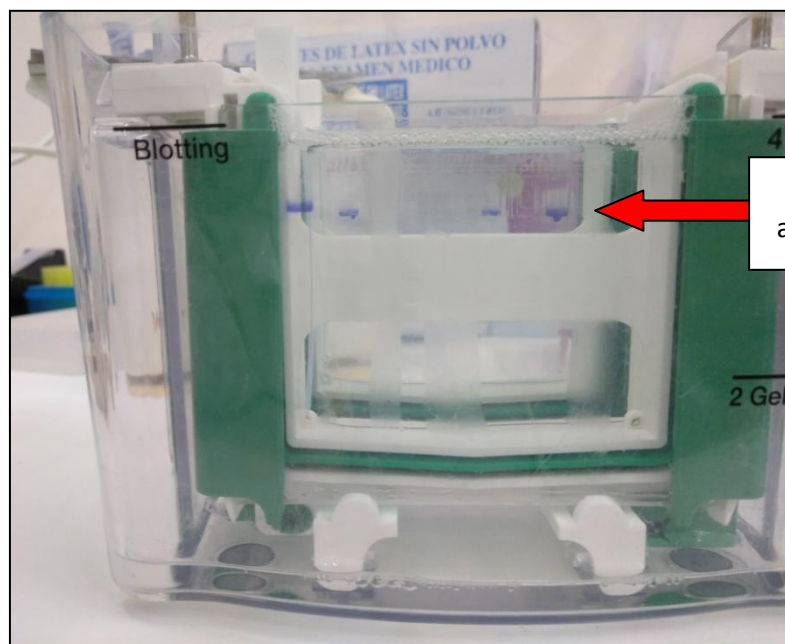
El següent pas seria carregar les mostres en els pous, però clar, un cop s'anessin dibuixant les línies cap a baix, no sabríem quin pes molecular tenen les

proteïnes. Per aquest motiu, abans de carregar les mostres vam posar un marcador de pes molecular.

Lavors, primer de tot vam carregar el marcador. Una cosa important a l'hora de carregar gels és no fer gels simètrics, perquè nosaltres tenim una estructura que és transparent, i si en un gel carreguem en el primer pou i en l'altre en l'últim, si el girem l'últim pou passa a ser el primer. Per tant, a l'hora de carregar hem de tenir present no carregar en posicions simètriques, perquè ens podrien dur a la confusió. Nosaltres vam carregar 5 µl de marcador en els pous 1, 2, 3 i 4.



Imatge 56: Marcador



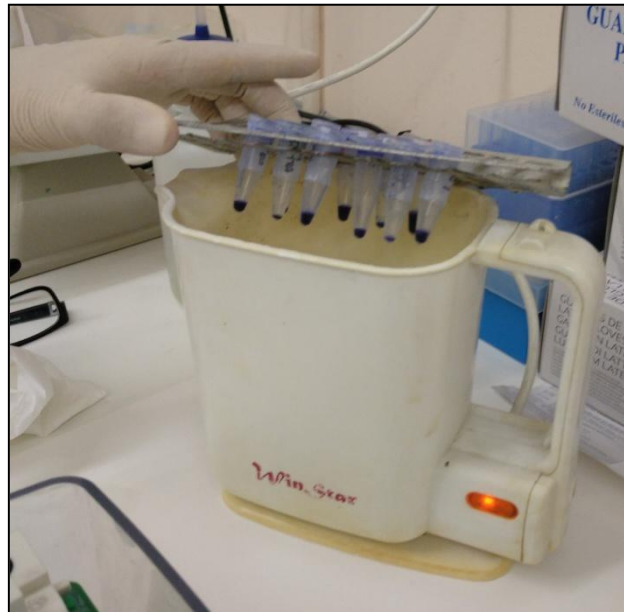
Imatge 57: Marcador carregat

Ja carregat el marcador ja podíem començar a carregar les mostres, aquestes contenen les proteïnes dels espermatozous de diferents gossos de diverses races, es recull l' ejaculat, la fracció que conté els espermatozous, i llavors aquests espermatozous s'homogeneïtzen amb una màquina que és diu sonicador per separar les proteïnes.

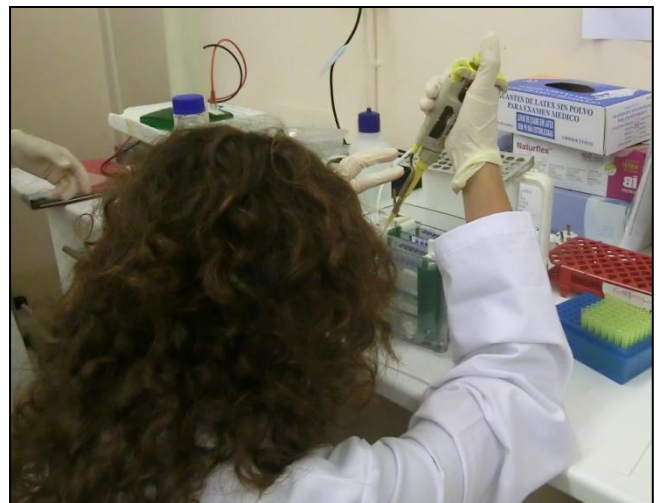
Però, aquestes proteïnes estan diluïdes de tal manera que tenen certa densitat i fa que sigui complicat de carregar-les, per tant, necessitem escalfar-les una mica abans de carregar-les. De manera que vam agafar un escalfador d'aigua o bany maria i hi vam col·locar les mostres a sobre mitjançant una gradeta.

Per saber fins quan escalfar-les, vam observar el tub eppendorf i, quan aquest va començar a suar, és a dir, quan ja es veia condensació, vam començar a

carregar les mostres. Per fer-ho, vam agafar 10µl de cada mostra i les vam anar col·locant en els pous, intentant que aquesta no anés als pous de la vora ja que es barrejarien.

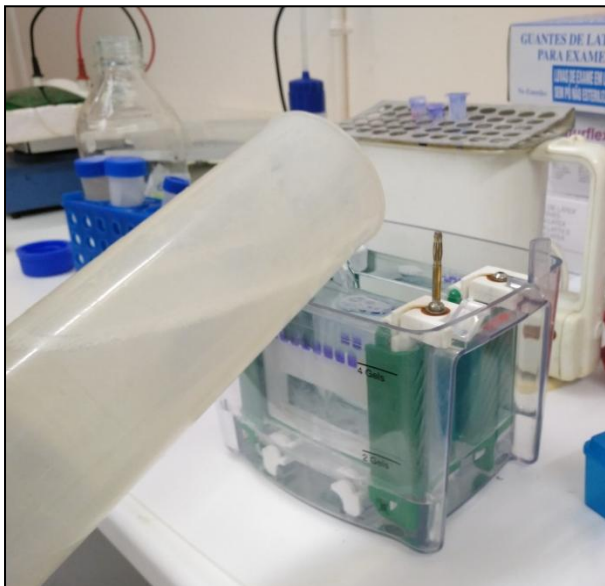


Imatge 58: Mostres escalfant-se



Imatge 59 i 60: Carregant les mostres

Quan ja havíem acabat de carregar, vam acabar d'omplir el suport de tampó d'electroforesi fins la marca dels quatre gels. Després, vam posar la tapa del suport i vam encaixa el vermell amb vermell i el negre amb negre.



Imatge 61: Posant el tampó d'electroforesi

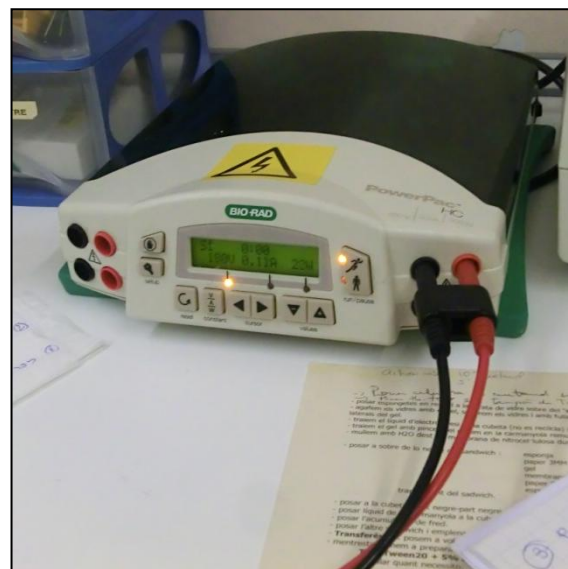


Imatge 62: Mostres carregades

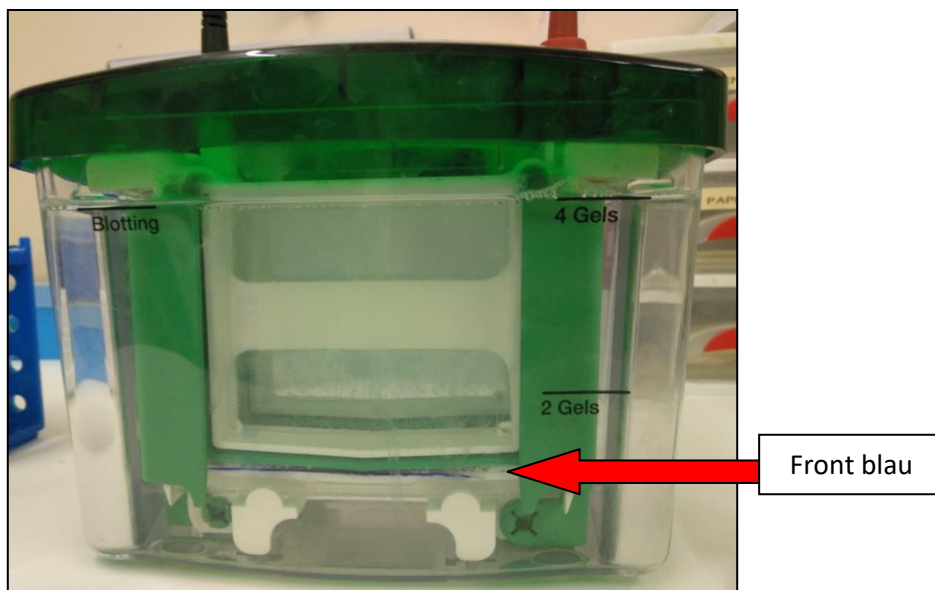
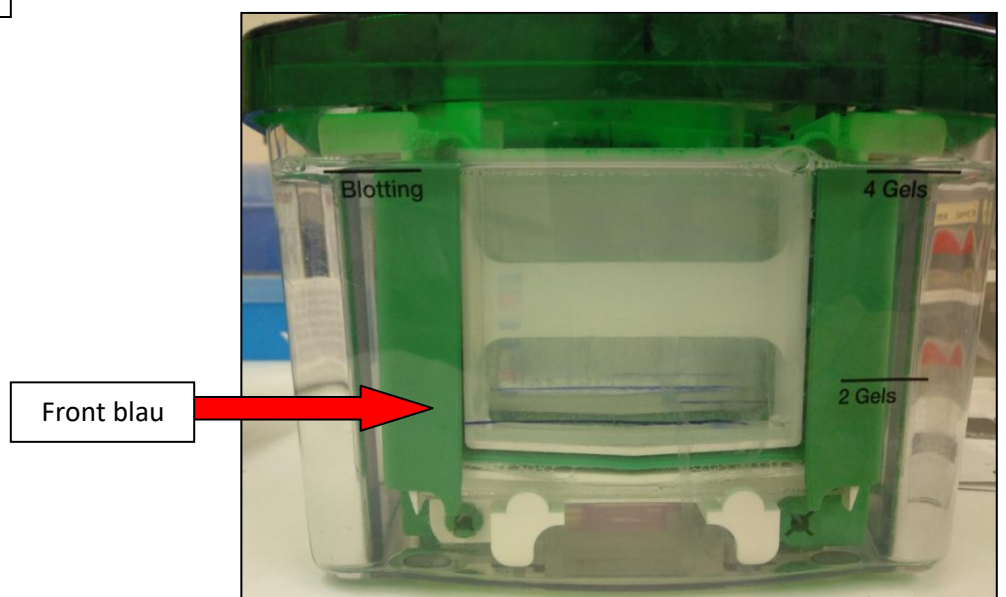
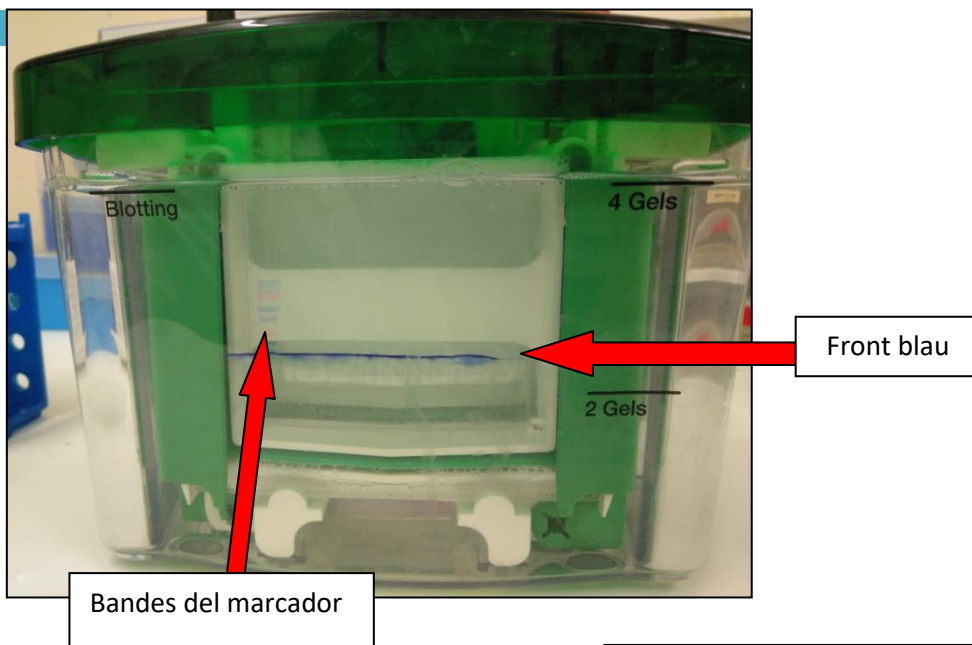
Ja preparat, ho vam endollar a la màquina d'electroforesi, negre amb negre i vermell amb vermell, ho vam posar a uns 180V i vam deixar les proteïnes córrer pel gel. Si observàvem el suport, podíem observar com s'anaven formant bombolles. I, per saber quan ja s'havia acabat l'electroforesi o no, simplement vam anar mirant el front blau, ja que quan aquest hagués sortit del gel, significaria que l'electroforesi ja hauria acabat.



Imatge 63: Suport connectat



Imatge 64: Màquina d'electroforesi



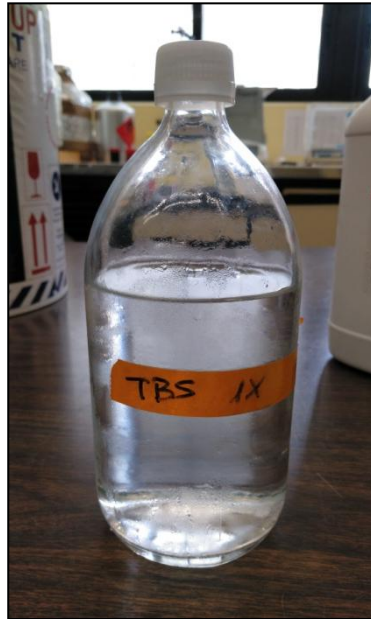
Imatge 65, 66 i 67: Evolució del front blau

Mentrestant, com que el procés d'electroforesi és bastant llarg vam anar preparant el tampó de bloqueig (100ml de TBS+BSA) que utilitzaríem més tard. Per preparar 50ml de tampó s'han d'afegir 2'5g de BSA, per tant, com que nosaltres volíem preparar 100ml de tampó, vam haver d'afegir 5g de BSA.

Per fer-ho, vam pesar 5g de BSA mitjançant una bàscula de precisió i els vam diluir amb 100 ml de TBS 1X. Com que costa molt de diluir, vam utilitzar un vòrtex, i ho vam col·locar en una matràs aforat de 100ml.



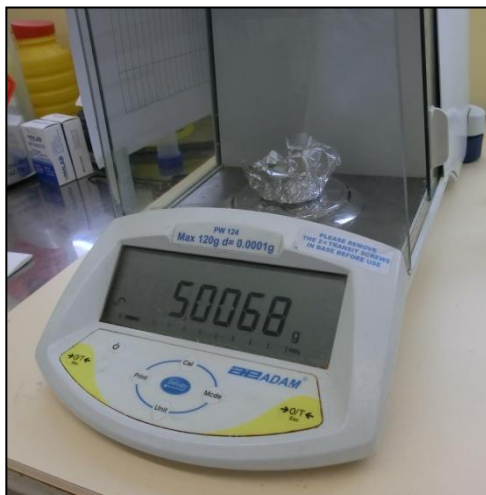
Imatge 68: BSA



Imatge 69: TBS 1X



Imatge 70: BSA+TBS



Imatge 71: Pesant el BSA



Imatge 72: Diluint el BSA

7.3.2 Transferència

Quan tot el front blau ja havia sortit del gel, passats uns aproximadament 45', vam apagar la màquina i vam començar la següent fase: la transferència.

Primer de tot, vam agafar l'aparell per les transferències, vam traure els dos cassets i els hi vam treure les tapes.

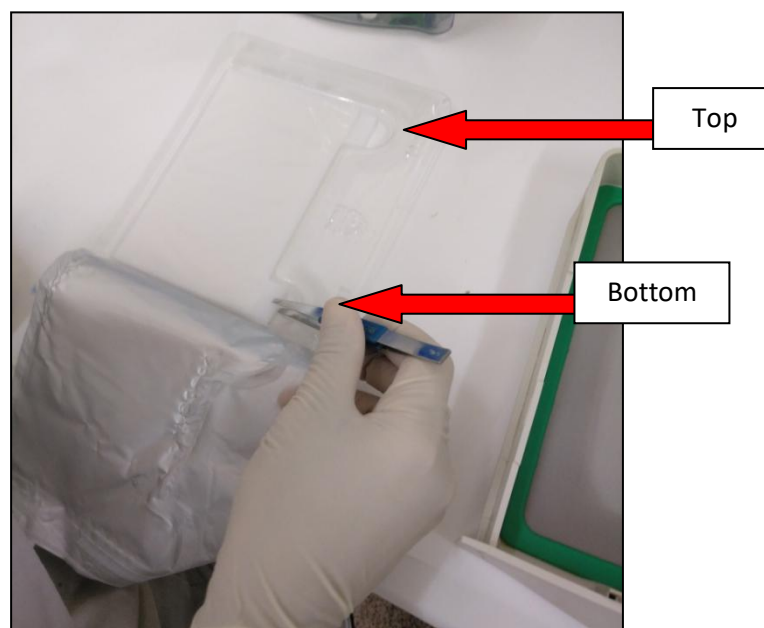


Imatge 73: Aparell de transferència

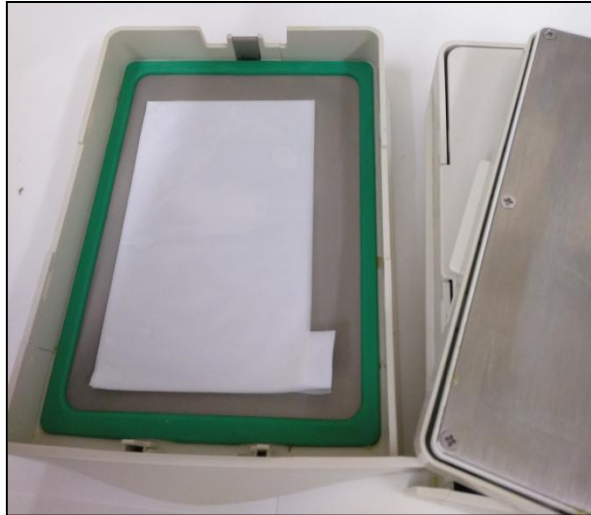


Imatge 74: Cassets

Lavors, abans de treure els gels, vam començar a preparar les membranes de nitrocel·lulosa per a la transferència. Per fer-ho, vam agafar un paquet de membranes i vam observar que en un costat hi posava Top (dalt) i Bottom (baix). Per tant, vam agafar la part del Bottom amb unes pinces hi ho vam col·locar en un dels dos cassets, de manera que quedaria sota els gels.



Imatge 75: Agafant el Bottom



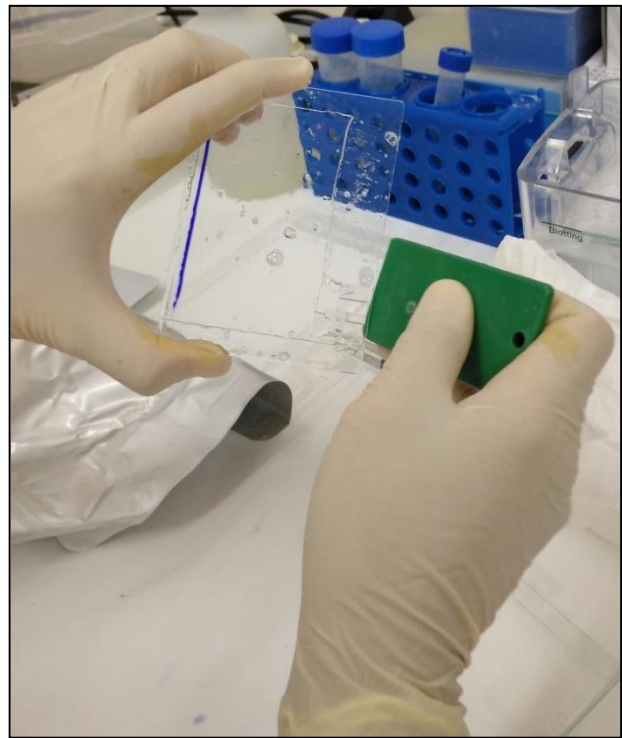
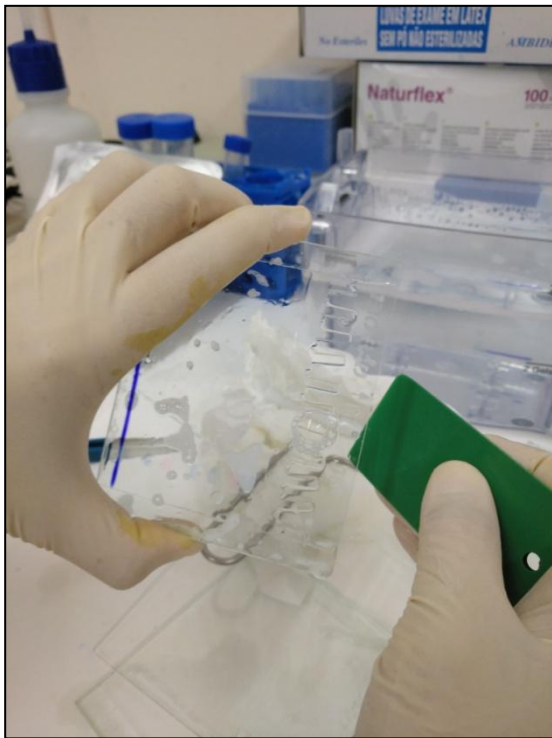
Imatge 76: Bottom en el casset

Després, vam desmuntar l'aparell de l'electroforesi, vam treure els quatre suports amb els gels i en vam treure els gels d'aquestes. Per fer-ho, vam agafar una mena d'espàtula de plàstic, la vam introduir entre els dos vidres i vam fer pressió fins que els dos vidres es van separar.



Imatge 77 i 78: Desmuntant l'aparell d'electroforesi

El gel pot ser que es quedi enganxat al vidre de sota o al vidre de dalt, però això no té importància. Llavors, mitjançant l'espàtula de plàstic, vam treure els contorns laterals del gel i l' stacking, tot seguint la línia que es podia observar entre el gel i l' stacking.



Imatge 79 i 80: Traient l' stacking

Utilitzant la mateixa espàtula de plàstic, vam agafar el gel amb molta cura tractant de no trencar-lo, i el vam col·locar sobre el Bottom, en la part superior, intentant que ninguna part del gel es sobresortís de les membranes.

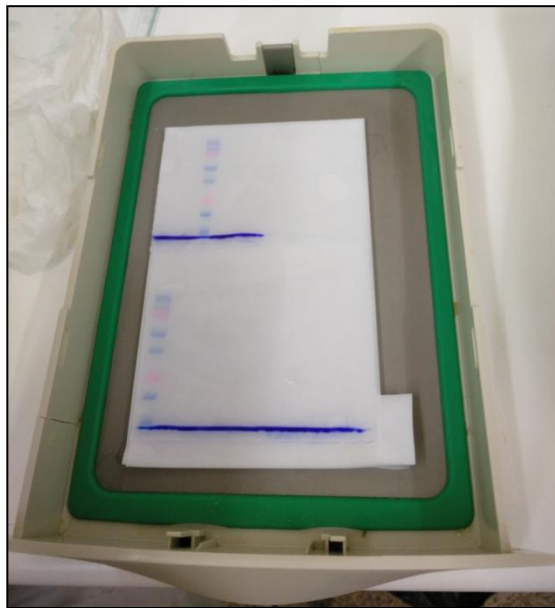


Imatge 81: Agafant el gel

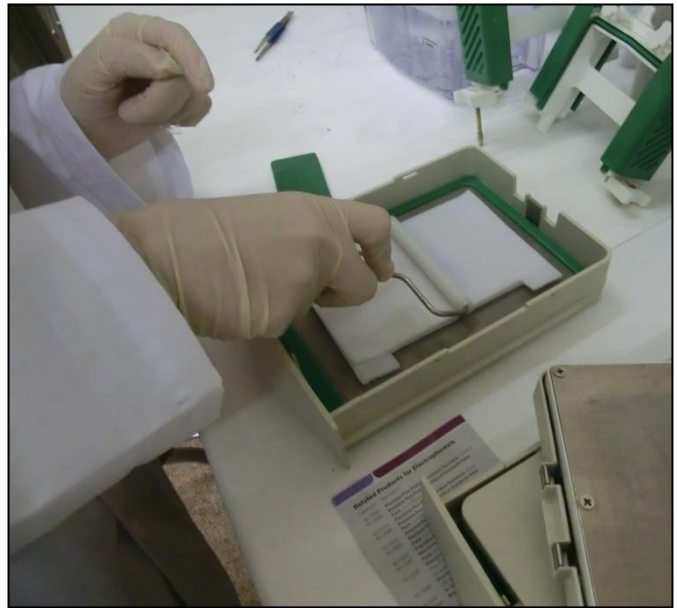


Imatge 82: Col·locant el gel

En un Bottom hi caben dos gels, així que vam repetir el mateix procés amb un altre gel i a l'acabar, vam agafar la part del Top i la vam col·locar sobre dels gels. Per evitar que quedessin bombolles, vam utilitzar una rodeta per aplanar les membranes, evitant tocar la membrana amb les mans.



Imatge 83: Gels en les membranes

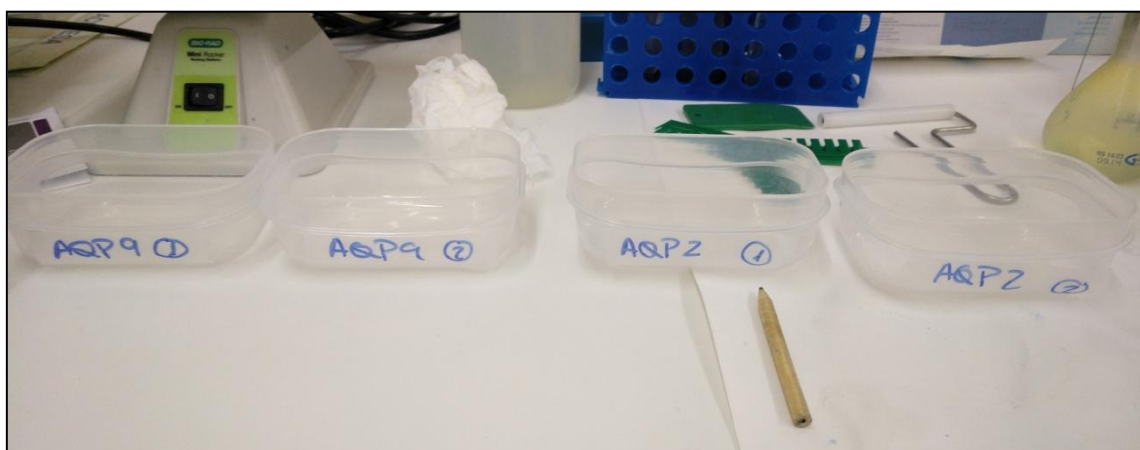


Imatge 84: Aplanant les membranes

Al finalitzar, vam tancar el casset amb molta cura i vam fer el mateix amb l'altre, utilitzant un altre paquet de membranes.

Llavors, vam col·locar els dos cassets ja preparats en la màquina de transferència, la vam engegar i vam esperar 7', ja que aquest és el temps en que tarda la màquina en fer la transferència.

Mentrestant, vam agafar quatre capsetes on després posaríem les membranes ja transferides i les vam marcar amb celo i retolador permanent. En dues capsetes hi vam posar AQP2, ja que hi posaríem l'anticòs de l'AQP2, i en les dues altres AQP9, ja que posaríem l'anticòs de l'AQP9.



Imatge 85: Capsetes marcades

Quan ja s'havia acabat la transferència, vam obrir els cassets i en vam treure el Top. Vam agafar la part del Bottom amb els gels, vam separar els gels i els vam llençar ja que ja no els necessitaríem més.



Imatge 86: Obrint els cassets

Lavors, com que en una membrana hi teníem dos gels transferits, el que vam fer va ser tallar-la. Per saber on havíem de tallar sense afectar a ningun dels dos gels, ens vam guiar mitjançant les ratlles del marker, quan s'acabaven les ratlles del marcador significava que s'acabava el gel.



Imatge 87: Membranes transferides



Imatge 88: Tallant les membranes

Vam fer això amb la membrana del casset restant, i a l'acabar vam col·locar les quatre membranes ja tallades i transferides en les capsetes marcades anteriorment.

A vegades les ratlles dels marcadors després de tots els rentats s'esborren, per tant, com que les aquaporines tenen un pes molecular al voltant dels 30KDa, mitjançant un llapis vam marcar les ratlles que s'acostaven més als 30KDa, en aquest cas eren les de 25KDa i 37KDa.



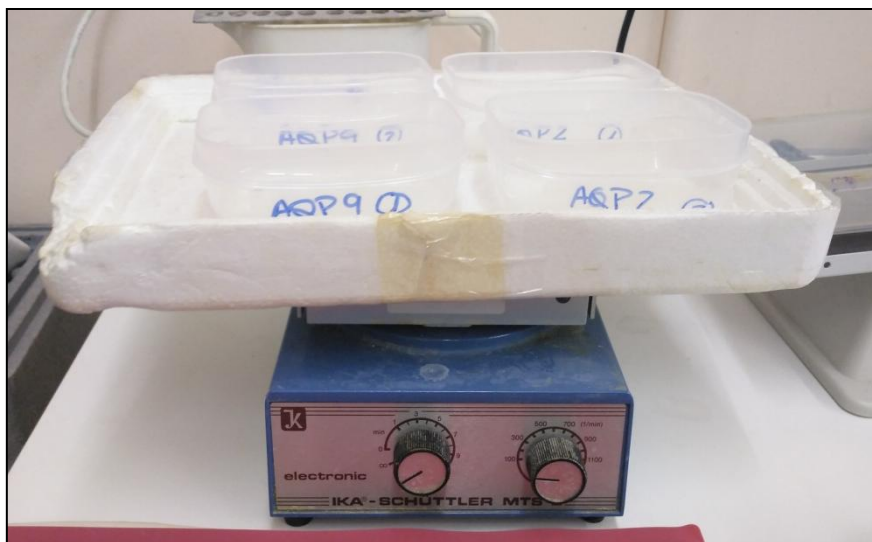
Imatge 89: Marcant les ratlles

A més, en una membrana on el marcador està com molt al mig, podríem confondre la part superior i inferior de la membrana, per tant, com que un cop s'haguessin esborrat no sabríem que és dalt i que és baix, també vam marcar la part superior esquerra com a punt de referència. Tot això ho fem amb molta cura, intentant no tocar cap altre lloc per no alterar els resultats.

7.3.3 Bloqueig i detecció

En acabar vam començar la tercera fase: el bloqueig i la detecció.

Primer de tot vam posar una mica de tampó de bloqueig del que havíem preparat en les capsetes fins que les membranes quedessin cobertes, i ho vam deixar reposar una hora sacsejant a l'agitador.



Imatge 90: Membranes amb BSA+TBS

El tampó de bloqueig es posa per fer un bloqueig, és a dir, impedir que es produeixin unions inespecífiques entre l'anticòs i la membrana, la qual cosa podria alterar els nostres resultats.

Ja passada l'hora, vam treure el tampó de bloqueig de les capsetes i hi vam afegir els anticossos primaris corresponents, en les capsetes de l'AQP2 l'anticòs de l'AQP2 i en les capsetes de l'AQP9 l'anticòs de l'AQP9. A l'acabar vam tancar les capsetes i les vam deixar reposant tota la nit a la nevera. Aquests anticossos que vam utilitzar eren anticossos reciclats, és a dir, que ja s'havien utilitzat en altres experiments.



Imatge 91: Posant anticòs primari



Imatge 92: Capsetes reposant

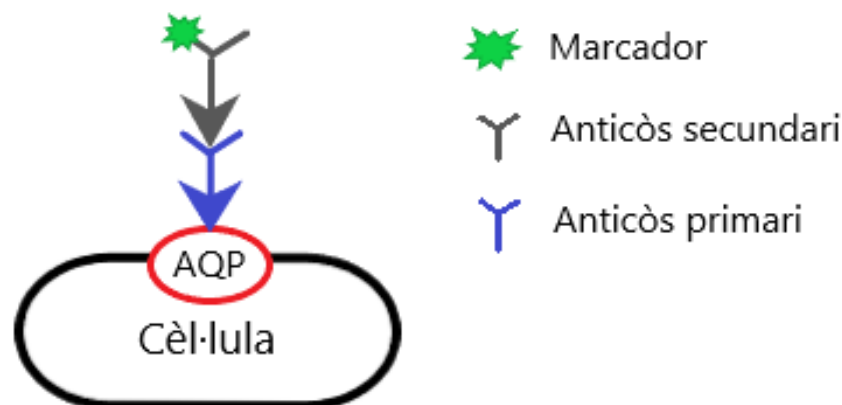
Al dia següent, com que les membranes havien estat tota la nit a la nevera, abans de fer qualsevol cosa les vam haver de posar a temperar a l'agitador.

Els anticossos primaris són anticossos contra la proteïna que nosaltres estem buscant, de manera si aquesta proteïna es troba expressada en la cèl·lula, aquests anticossos el que faran serà enganxar-se a aquesta proteïna que estem buscant. Aleshores, amb els anticossos primaris ja enganxats a la proteïna, el que hem de fer és detectar aquest anticòs primari que nosaltres hem utilitzat, i per això fem servir un anticòs secundari.

Els anticossos primaris es fabriquen a partir del sèrum d'una espècie en concret, pot ser ratolí, conill, cabra... Llavors, quan triem l'anticòs secundari el que hem de fer és mirar en quina espècie s'han fabricat els anticossos primaris, ja que aquests anticossos són "anti-espècie".

En el nostre cas tan l'anticòs de l'AQP2 com el de l'AQP9 es van fer a partir de sang de conill i, per tant, el que vam fer va ser buscar el anticòs secundari que fos anti-conill. Normalment són antirabbit (anti-conill), antimouse (anti-ratolí) i antigoat (anti-cabra), el més habitual.

Llavors, l'anticòs secundari porta una mena de fluorescència, una molècula enganxada que actua com a marcador i que al revelar les membranes la podem observar en la pel·lícula radiogràfica.



Imatge 93: Esquema dels anticossos

No obstant, quan posem un anticòs aquest es va enganxant a les proteïnes, però sempre es corre el risc de que hi hagi anticòs solt que estigui flotant i que no s'enganxi. Per evitar això, vam haver de fer un rentat de les membranes, de manera que tot l'anticòs primari que no estigués enganxat a la proteïna l'eliminaríem.

Per rentar les membranes vam fer servir TBST, s'anomena així perquè a part del TBS porta un detergent que s'anomena Tween20.

Lavors, primer de tot el que vam fer va ser treure els anticossos primaris de les capsetes i tornar-los a posar en els seus respectius pots per reutilitzar-los en una altra ocasió. I a l'acabar, vam posar una mica de TBST en les capsetes fins que les membranes quedessin cobertes, vam tornar a posar les capsetes a l'agitador i vam cronometrar 5'. Aquest procés el vam fer tres vegades.



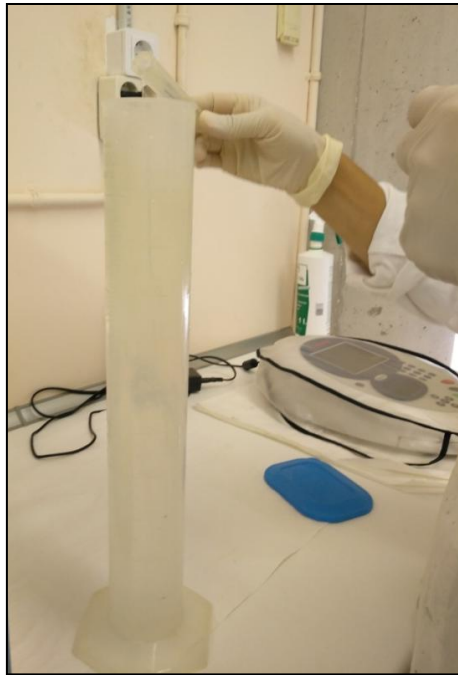
Imatge 94: Reciclant anticòs primari



Imatge 95: TBST

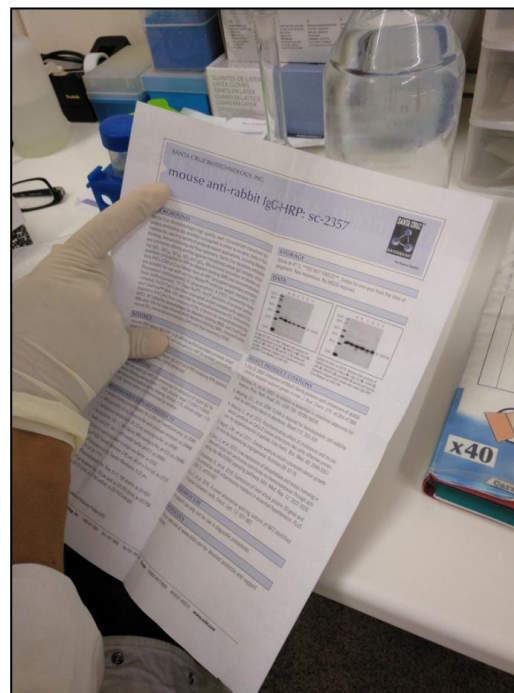
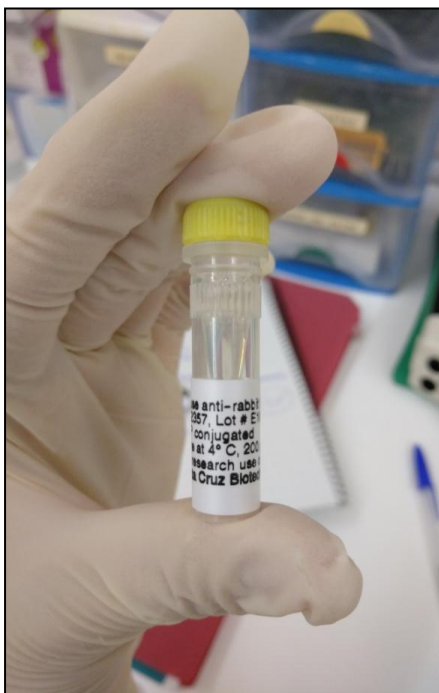
Mentrestant, com que no teníem prou TBST, en vam haver de preparar més.

Nosaltres teníem TBS 10X, però volíem treballar al 1X. Per tant, per fer 1L de TBST, vam agafar 900ml d'aigua destil·lada i 100ml de TBS 10X i, com que es tractava de TBST, hi vam afegir 1ml de Tween20.



Imatge 96: Afegint el Tween20

A més, com que per detectar l'anticòs primari necessitàvem anticòs secundari, el següent pas va ser preparar l'anticòs secundari, i per fer-ho teníem 10 ml de BSA+TBS per cada membrana. Com que els anticossos primaris estaven fets de sèrum de conill, vam haver de buscar un anticòs que fos anti-conill. Llavors, vam agafar un anticòs mouse antirabbit, és a dir, un anticòs secundari fet a partir de sèrum de ratolí per actuar sobre els anticossos primaris de conill.



Imatge 97 i 98: Anticòs secundari

Lavors, la dilució del anticòs que volíem preparar era 1:5000, de manera que en 5ml de BSA+TBS havíem de posar 1 microlitre d'anticòs. Per tant, com que en total teníem 40 ml de BSA+TBS, hi vam haver de posar 8 microlitres d'anticòs.



Imatge 99: Preparant anticòs secundari

A l'acabar els rentats, vam treure el TBST de les capsetes, vam posar l'anticòs secundari ja preparat, 10ml per membrana, i ho vam deixar reposant 35' a l'agitador.



Imatge 100: Posant anticòs secundari

En acabar els 35', vam treure l'anticòs secundari i, tal com passa amb el primari, hem de rentar les membranes per evitar que els anticossos no enganxats es quedessin voltant. Per fer-ho, vam fer 6 rentats amb TBST com els d'abans, però en aquest cas cadascun havia de durar 10'.



Imatge 101: Abocant TBST

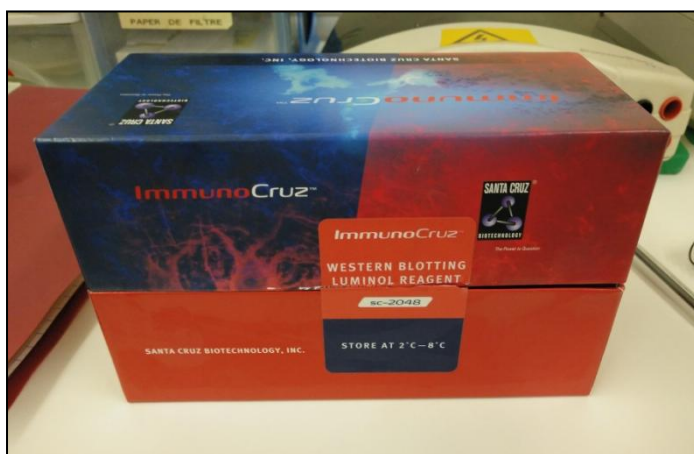


Imatge 102: Membranes rentant-se

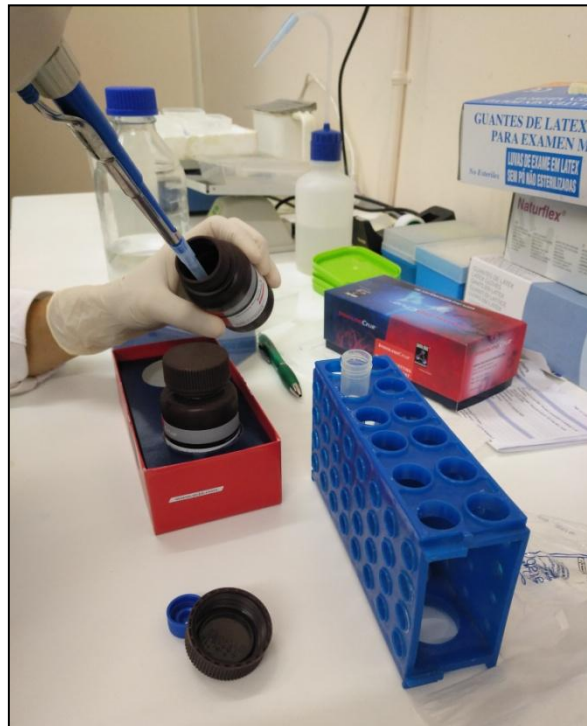
7.3.4 Revelar

I, al finalitzar el rentats, vam començar l'última fase: revelar.

Per fer-ho, primer de tot vam haver de preparar el reactiu per revelar. Aquest és composta de dos reactius i s'ha de posar el mateix volum de cadascun. Com que necessitàvem 2ml de reactiu per revelar per membrana, un total de 8ml de reactiu, vam agafar 4ml de cadascun dels dos components.



Imatge 103 i 104: Components del reactiu per revelar



Imatge 105: Preparant el reactiu per revelar

A continuació, vam començar a preparar les membranes per revelar.

Vam agafar un tros de plàstic on més tard posaríem les membranes, i el vam col·locar sobre un taulell, subjectant-lo amb cinta adhesiva. Llavors abans de posar-hi les membranes, el vam netejar amb aigua destil·lada.

Després, vam agafar les quatre capsetes amb les membranes i les vam col·locar sobre el taulell al costat del plàstic. Al fer-ho, les vam col·locar amb un cert ordre per evitar barrejar-les i oblidar quines eren les membranes de l'AQP2 i quines les de l'AQP9. Nosaltres vam col·locar a l'esquerra les dues membranes de l'AQP2 i a la dreta les dues altres de l'AQP9.



Imatge 106: Ordre capsetes

Lavors, mitjançant unes pinces vam anar traient les membranes de les capsetes i les vam col·locar sobre el plàstic seguint el mateix ordre determinat anteriorment. A l'acabar, vam posar aproximadament 1ml de reactiu per revelar a cadascuna de les membranes mitjançant una pipeta, tractant de cobrir totes les membranes, i vam cronometrar 5'.



Imatge 107: Col·locant les membranes

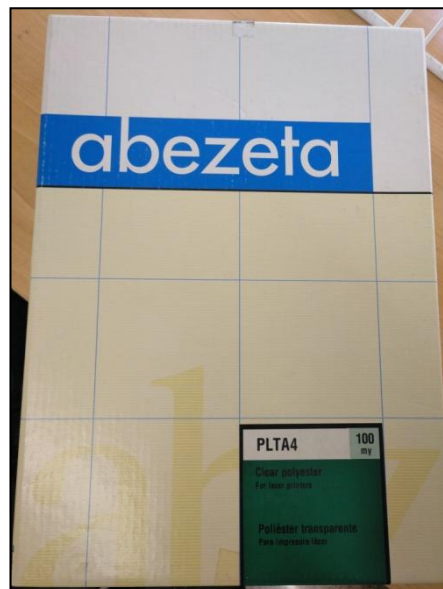


Imatge 108: Posant el reactiu

Mentrestant, vam anar preparant el xassis per fer radiografies o casset radiogràfic. Vam agafar una làmina de polièster, la vam tallar per la meitat i vam col·locar una de les meitats en el xassis.



Imatge 109: Tallant la làmina



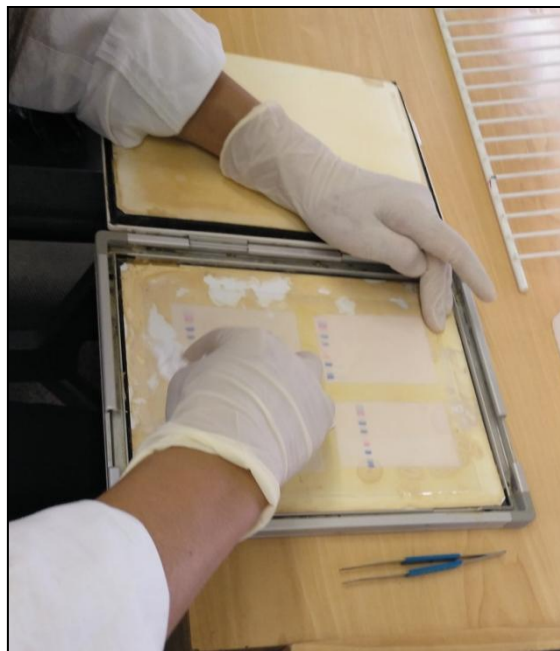
Imatge 110: Làmines de polièster

A l'acabar els 5 min, vam col·locar les membranes en el xassis sobre la meitat de la làmina col·locada seguint l'ordre indicat, i vam posar l'altra meitat de la làmina de polièster a sobre d'aquestes.



Imatge 111: Col·locant les membranes

Com que les membranes venen d'estar amb líquid, abans de tancar el xassis vam eixugar perquè evitar que quedés una mica de líquid, ja que sinó es mullaria la pel·lícula radiogràfica i es podrien formar taques. Per fer-ho vam agafar paper i vam anar acariciant la làmina superior fins treure tot el líquid i, d'aquesta manera també, treure les bombolles que s'haguessin pogut formar entre el plàstic i les membranes.

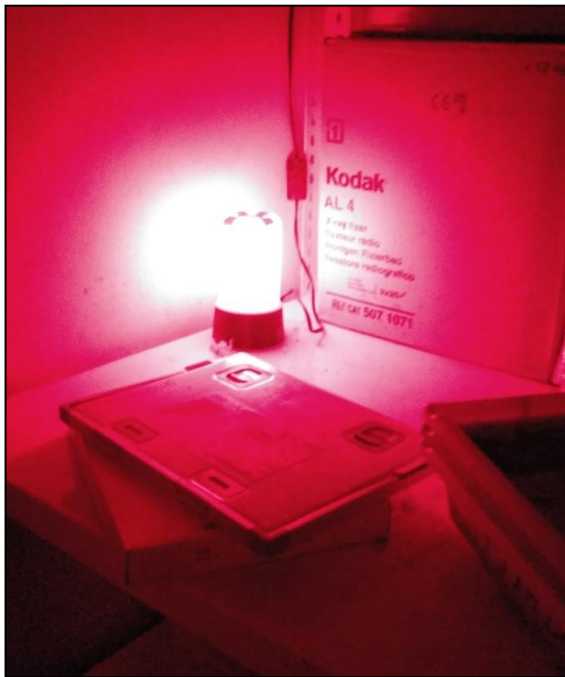


Imatge 112: Traient el líquid

Al finalitzar vam tapar el xassis, vam agafar un carret i hi vam anar posant tot el material que necessitaríem per revelar: revelador, fixador, pinces i safates de plàstic, la llum vermella i les pel·lícules.

Les pel·lícules radiogràfiques estan sempre tancades i protegides, a més de la caixa de cartró, per una bossa de plàstic negra opaca per evitar que li toqui la llum directa perquè sinó es vela. L'única llum amb la que es pot treballar amb pel·lícula radiogràfica és llum vermella. De manera que, quan ja vam tenir el carret preparat amb tot el material, vam anar a una cambra fosca per revelar.

A l'arribar, com que havíem de treure les pel·lícules, vam tancar les llums i vam obrir la llum roja. Llavors, vam obrir la caixa amb les pel·lícules, n'hi vam agafar una i vam doblegar la part inferior dreta per no confondre'ns sobre quina és la part posterior i quina és la part inferior. A l'acabar, vam col·locar la pel·lícula dins el xassis i la vam deixar que s'anés exposant.



Imatge 113: Llum roja



Imatge 114: Pel·lícules radiogràfiques

Mentrestant, com que teníem el xassis tancat, vam tornar a obrir la llum i vam començar a preparar les tres safates de plàstic que havíem portat. Per revelar radiografies el primer que es fa és revelar, per fer-ho s'utilitza un reactiu que s'anomena revelador. Un cop que reveles, es posa la pel·lícula en aigua i, perquè la imatge no l'alteri la llum, s'ha de fixar amb un altre reactiu que és el fixador.

Llavors, en una hi vam posar el revelador, en l'altra hi vam posar el fixador i en la última hi vam posar aigua normal de l'aixeta. Al acabar vam tornar a tancar la llum i vam començar a revelar.



Imatge 115: Posant el fixador

Primer de tot vam obrir el xassis, vam treure la pel·lícula i, mitjançant unes pinces de plàstic, vam posar la pel·lícula a la safata amb el revelador. Vam anar agitant la safata fins que es va començar a observar que apareixia una imatge en la pel·lícula (aprox. 2').

Mentrestant no s'allunyi la pel·lícula del revelador aquest continuarà actuant de manera que, quan vam creure que la imatge es veia prou bé, la vam posar ràpidament en la safata d'aigua uns instant per rentar. I, amb les mateixes pinces, vam tornar a agafar la pel·lícula i la vam posar en el fixador.

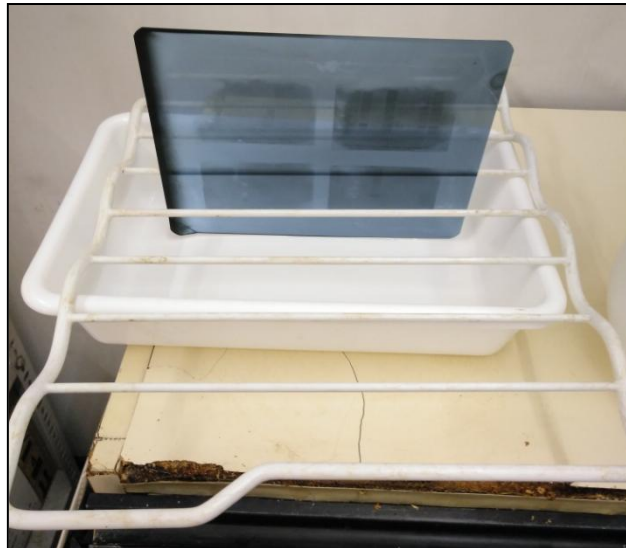
Mica en mica la pel·lícula s'anava tornant més transparent, llavors, un cop que ja podíem veure a través de la pel·lícula, vam tornar a posar la pel·lícula a l'aigua i ja podíem obrir el llum.



Imatge 116: Pel·lícula en aigua

A l'acabar vam recollir el revelador i el fixador per tal de reutilitzar-los en una altra ocasió, i vam tornar al laboratori per netejar la pel·lícula amb aigua destil·lada per tal que la imatge quedés bé.

Finalment vam posar la pel·lícula a assecar recolzada en una reixa, evitant que el lloc on hi havia la imatge toqués enlloc perquè es podria córrer la imatge, i vam netejar el material utilitzat amb aigua destil·lada.



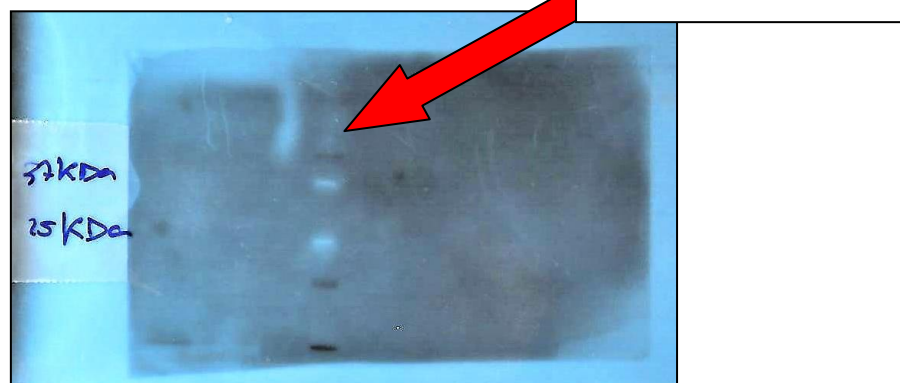
Imatge 117: Pel·lícula assecant-se

Per últim, quan ja estava seca, amb cinta adhesiva i un retolador vam marcar quina era cada imatge i els pesos moleculars entre els quals es trobaven les bandes que havien sortit.

7.4 Resultats

Com a resultat vam obtenir quatre imatges, dues dels dos gels de l'AQP2, i dues dels dos gels de l'AQP9.

7.4.1 Gels AQP2

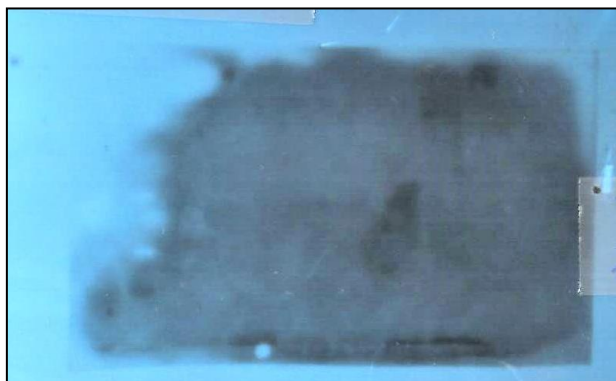


Imatge 118: Gel de l'AQP2

En aquesta imatge podem observar una columna amb diverses ratlles, aquesta és el marcador, el qual ens indica diversos pesos moleculars. Les dues ratlles en blanc són aquelles que vam marcar en llapis i que, per tant, ens mostren els pesos entre els quals hauria d'aparèixer la proteïna que estem buscant. En aquest cas, com que les aquaporines tenen un pes molecular al voltant dels

30KDa, les dues ratlles en blanc ens mostren els 37 KDa i els 25 KDa respectivament.

Observant la radiografia del gel podem veure que entre aquests pesos moleculars no apareix cap ratlla, fet que ens indica que els anticossos no s'han enganxat a cap proteïna i, per tant, en les mostres de semen de gos utilitzades no hi ha AQP2.



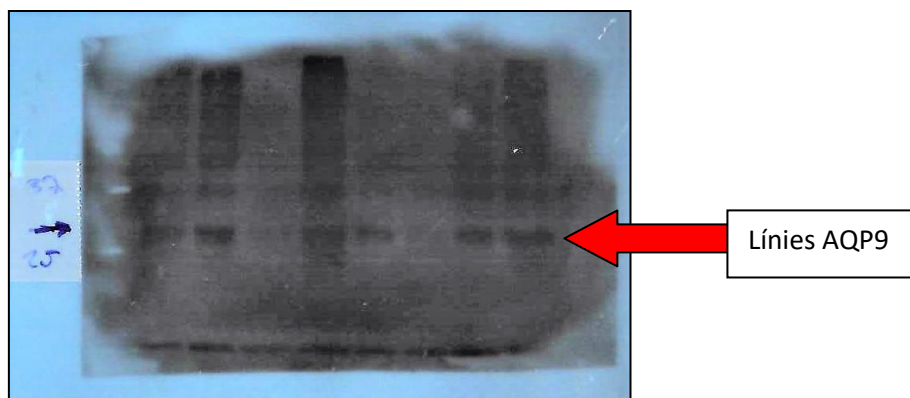
Imatge 119: Gel de l'AQP2

En el segon gel de l'AQP2 podem observar que la part superior esquerra no es veu amb claredat, això es degut a que el gel no es va revelar del tot bé. Aquest fet provoca que no puguem observar amb claredat les línies del marcador.

Malgrat això, en la imatge podem observar que no ha aparegut cap línia en tot el gel i, per tant, no s'ha detectat la presència de l'AQP2.

Aquestes dades concorden amb els resultats obtinguts en el primer gel. Per tant, l'AQP2 no està present en el semen de gos.

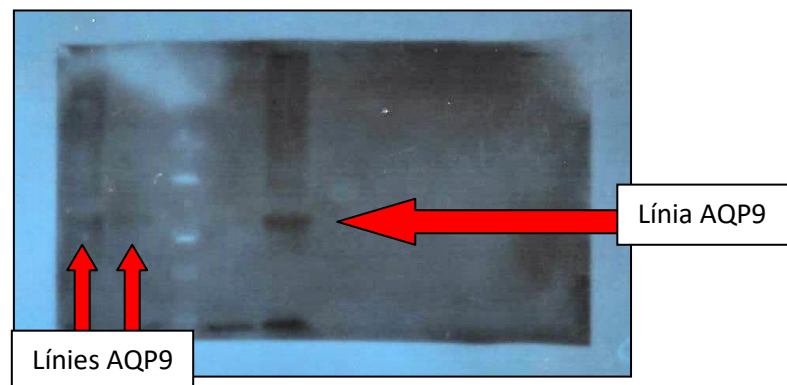
7.4.2 Gels AQP9



Imatge 120: Gel de l'AQP9

Tal com succeeix amb els gels de l'AQP2, a l'esquerra de tot de la imatge podem observar dues ratlles blanques, les quals ens indiquen els pesos moleculars entre els quals hauriem de trobar la proteïna.

Observant la resta del gel podem veure que entre els 37KDa i els 25KDa apareix una filera de línies fosques. Aquestes ens mostren que s'ha detectat anticòs secundari, la qual cosa significa que en les mostres de semen de gos hi ha AQP9.



Imatge 121: Gel de l'AQP9

En el segon gel de l'AQP9 podem observar, a l'esquerra, la columna del marcador amb les dues línies blanques que ens marquen els 37KDa i 25KDa.

I, examinant la resta del gel, podem observar tres línies fosques, dues més marcades i una més difusa, les quals ens mostren la presència de l'AQP9. En aquest gel solament apareixen tres línies fosques perquè no vam posar tantes mostres com en el primer gel.

Com que els resultats dels dos gels coincideixen, l'AQP9 està present en el semen de gos.

8. CONCLUSIONS

A partir de la recerca duta a terme en la part teòrica d'aquest treball, he pogut aprofundir en el descobriment de les aquaporines, he après la seva estructura i funcionament, he pogut realitzar un recorregut pels diversos dels estudis realitzats fins el moment per tal d'estudiar les seves funcions, i he pogut aprendre la relació d'aquestes proteïnes amb la criopreservació, principalment de semen.

A més, havent estudiat i investigat a fons aquestes proteïnes m'ha ajudat a comprendre la magnitud d'aquest descobriment i la seva rellevància en el món de la ciència i la investigació.

Gràcies a la visita al banc de semen he pogut conèixer el funcionament d'aquests, com per exemple el procediment que es duu a terme per escollir els donants, o el procés que s'utilitza per congelar el semen i el que s'utilitza per congelar els embrions i òvuls. També he pogut resoldre els dubtes que inicialment tenia, aprofundint així en qüestions com quins crioprotectors s'utilitzen en el moment de criopreservar semen, o quins són els principals problemes d'aquestes tècniques.

Pel que fa a la pràctica de laboratori, havent-la acabat i havent analitzat els resultats obtinguts del gel de l'AQP2, podem extreure la conclusió que el semen de gos no presenta AQP2. En canvi, observant els resultats del gel de l'AQP9 podem arribar a la conclusió que el semen de gos sí presenta AQP9, proteïna que, segons el meu coneixement, encara no havia estat identificada en el semen de gos.

El fet d'haver realitzat per primera vegada un treball d'aquesta magnitud m'ha permès aprendre a buscar informació fiable a Internet, a llegir articles científics; i a realitzar hipòtesis, analitzar els resultats obtinguts i extreure'n conclusions.

A més a més, he après que en el món de la investigació un resultat negatiu segueix sent un resultat i, tot i haver arribat a una conclusió a partir dels resultats obtinguts, sempre fa falta més investigació per acabar d'esclarir el que estàs estudiant.

Gràcies a aquest treball he après com es realitza la identificació de proteïnes mitjançant un Western Blot, una de les tècniques més utilitzades al laboratori. A més, el fet de poder realitzar aquesta pràctica amb l'ajut d'investigadors de la

UAB m'ha permès conèixer més d'aprop com és el món de la investigació i m'ha ajudat a definir què és el que m'agrada i el que voldria estudiar en un futur.

Finalment, tot i que no he acabat fent el tema que inicialment havia escollit, gràcies a això he pogut descobrir, investigar i estudiar a fons unes proteïnes que no coneixia. Fet que m'ha ajudat a adonar-me que, tot i que les coses no sempre surtin com havies planejat, sempre pots acabar descobrint quelcom nou i interessant que t'acabi agradant molt.

9. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

9.1 Articles

- AGRE, Peter. «The Aquaporin Water Channels». *Proceedings of the American Thoracic Society*, vol. 3, núm. 1, març de 2006, p. 5-13
- AMEZCUA, Julio César; VERA, Rosario. «Las plantas y sus acuaporinas». *Ciencia – Academia Mexicana de Ciencias*, vol. 63, núm. 1, gener-març del 2012, p. 58-67
- BENGHA, Gheorghe. «Water Channel Proteins (Later Called Aquaporins) and Relatives: Past, Present, and Future». *IUBMB Life*, vol. 61, núm. 2, febrer de 2009, p. 112-133
- BOJ, Mónica; CHAUVIGNÉ, François; CERDÀ, Joan. «Aquaporin biology of spermatogenesis and sperm physiology in mammals and teleosts». *The biological bulletin*, vol. 229, núm. 1, agost del 2015, p. 93-108
- COPPO, José Antonio. «Acuaporinas». *Revista Veterinaria*, vol. 19, núm. 2, 2008, p. 167-178
- ECHEVARRÍA, Miriam; ZARDOYA, Rafael. «Acuaporinas: los canales de agua celulares». *Investigación y Ciencia*, núm. 363, desembre de 2006, p. 60-67
- RIVERO, Javier. «Capítulo 1 - Generalidades de la Criopreservación» *Proyecto fi de carrera, Universidad de Sevilla, Escuela Superior de Ingenieros, Ingeniería de Telecomunicación, Departamento de Física Aplicada III*, juliol 2012
- SÁNCHEZ, Julio César. «Acuaporinas: proteínas mediadoras del transporte de agua». *Colombia Médica*, vol. 34, núm. 4, 2003, p. 220-227
- SOLÉ, Miquel; BOADA, Montse; VEIGA, Anna. «Criopreservació i Tècniques de Reproducció Assistida». *Treballs de la SCB*, vol. 59, 2008, p. 233-248
- SOLÉ, Miquel; BOADA, Montse; VEIGA, Anna. «Criopreservació i Tècniques de Reproducció Assistida». *Treballs de la SCB*, vol. 59, 2008, p. 233-248
- STOREY, Kenneth B; STOREY, Janet M. «Molecular Biology of Freezing Tolerance». *Comprehensive Physiology*, vol. 3, núm. 3, juliol de 2013, p. 1283-1308
- STORNELLI, María Alejandra; Sota, Rodolfo Luzbel de la. «Fertilidad y Supervivencia del Semen Canino Criopreservado». *Analecta Veterinaria*, vol. 26, núm. 2, 2006, p. 29-38
- VERKMAN, A. S. «Aquaporins». *Current Biology*, vol. 23, núm. 2, 21 de gener de 2013, p. 52-55
- YESTE, M; MORATÓ, R; RODRÍGUEZ-GIL, JE; BONET, S; PRIETO-MARTÍNEZ, N. «Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology». *Reproduction in domestic animals*, vol. 52, núm. 4, octubre de 2017, p. 12-27

9.2 Webs

- ALDEAGLOBAL. *L'aparell reproductor masculí* [en línia] <<http://www.aldeaglobal.net/ido/lareproduccio/reproduccio/aparellreproductormasculi.html>> [Consulta: 15 d'Octubre de 2018]
- BIOLOGY DISCUSSION. *Structure, Functions and Types of Mature Sperms in Animals – Biology* [en línia] Kritika Jain <<http://www.biologydiscussion.com/notes/structure-functions-and-types-of-mature-sperm-in-animals-biology/768>> [Consulta: 25 d'Octubre de 2018]

- CIENCIA TODAY. *¿Qué son las células de Sertoli?* [en línia] Elena Verger Salom. 24 d'Agost de 2017 <<https://cienciatoday.com/celulas-sertoli/>> [Consulta: 23 d'Octubre de 2018]
- DICAS DE BELEZA. *Aquaporinas – O segredo da juventude* [en línia] <<http://belezabv.blogspot.com/2015/03/aquaporinas-o-segredo-da-juventude.html>> [Consulta: 15 de novembre de 2018]
- ECURED. *Conducto deferente* [en línia] 13 de desembre de 2012 <https://www.ecured.cu/Conducto_deferente> [Consulta: 18 d'Octubre de 2018]
- ESCORIAL VIC, Llibre digital de ciències. *L'aparell reproductor masculí – Teoria* [en línia] <<http://ciencias.escorialvic.org/?p=147>> [Consulta: 17 d'Octubre de 2018]
- ER SERVICES, Anatomy and Physiology II. *Anatomy and Physiology of the Male Reproductive System* [en línia] <<https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/anatomy-and-physiology-of-the-male-reproductive-system/>> [Consulta: 17 d'Octubre de 2018]
- GLUTS. *Cirugía para quiste del epidídimo* [en línia] 19 de desembre de 2011 <<http://delalinearectadelmarcodelapuerta.blogspot.com/2011/12/cirugia-para-quiste-del-epididimo.html>> [Consulta: 25 d'Octubre de 2018]
- MORFOEXPRESS. *Espermatogénesis* [en línia] Sadler Langman Jan. 2012 <<https://morfoexpress.wordpress.com/espermatogenesis/>> [Consulta: 20 d'Octubre de 2018]
- SLIDESHARE. *Complejo reproductivo masculino* [en línia] Luis G. Perez. 20 de novembre de 2014 <<https://es.slideshare.net/AnclesPerez/histologia-del-complejo-reproductivo-masculino>> [Consulta: 18 d'Octubre de 2018]
- STUDOCU, Anatomia Humana II (UAB). *Aparell reproductor masculí* [en línia] <<https://www.studocu.com/es/document/universitat-autonoma-de-barcelona/anatomia-humana-ii/apuntes/aparell-reproductor-masculi/2488109/view>> [Consulta: 23 d'Octubre de 2018]
- STUDOCU, Anatomia (UAB). *Aparell reproductor masculí* [en línia] <<https://www.studocu.com/es/document/universitat-autonoma-de-barcelona/anatomia/apuntes/aparell-reproductor-masculi/2403617/view>> [Consulta: 18 d'Octubre de 2018]
- THE NOBEL PRIZE. *Peter Agre, Nobel Lecture* [en línia] <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2003/agre/lecture/>> [Consulta: 26 de Juliol de 2018]
- UNIVERSIDAD DEL VALLE. *Este jueves, Primo Nobel de Química en Univalle* [en línia] 19 d'Agost de 2015 <<http://www.univalle.edu.co/lo-que-pasa-en-la-u/premio-nobel-de-quimica-en-univalle>> [Consulta: 10 d'Agost de 2018]
- XTEC. *L'aparell reproductor* [en línia] Rafel Villanueva <<http://www.xtec.cat/~rvillanu/reproductor/reproductor.htm>> [Consulta: 20 d'Octubre de 2018]

9.3 Llibres

- JIMENO, Antonio; UGEDO, Luis. *Biología 1 batxillerat*. Barcelona: Grup Promotor Santillana, 2016, 302 p., ISBN: 978-84-9047-672-7